

豚サーコウイルス（2型・組換え型）感染症（カルボキシビニルポリマーアジュバント加）不活化ワクチン

平成 28 年 1 月 20 日（告示第 95 号） 新規追加

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 2 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「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、カルボキシビニルポリマー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

PCV2ORF2 遺伝子組換えオートグラフィア核多角体ウイルス（AcNPV）N120-058W 株又はこれと同等と認められた株

2.1.1.2 性状

バキュロウイルスに感受性のある培養細胞で CPE を伴って増殖する。PCV2ORF2 たん白抗原を発現する。

2.1.1.3 継代及び保存

原株及び種ウイルスは、*Spodoptera frugiperda* 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。

原株は凍結して -60°C 以下で、種ウイルスは凍結して -35°C 以下で保存する。

2.2 製造用材料

2.2.1 培養細胞

Spodoptera frugiperda 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、ウイルスの増殖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

ウイルス培養液をろ過し、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、必要に応じて濃縮したものを原液とする。

原液について、3.2 の試験を行う。

2.3.4 原液の調整

原液を混合し、混合原液とする場合がある。

混合原液について、3.2.2 の試験を行う。

2.3.4 最終バルク

原液又は混合原液に、必要に応じて生理食塩液及び適量のアジュバントを添加し、最終バルクとする。

2.3.5 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、その試験方法とする。

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、その試験方法とする。

3.2.2 不活化試験

3.2.2.1 試験材料

3.2.2.1.1 試料

検体を試料とする。

3.2.2.1.2 培養細胞

Spodoptera frugiperda 細胞を用いる。

3.2.2.1.3 試験方法

試料 1 mL を 150cm² の培養細胞に接種し、25 ~ 29 °C で 7 日間培養し、次代に継代する。2 代目の細胞を 25 ~ 29 °C で 7 日間培養する。

3.2.2.1.4 判定

培養細胞に CPE を認めない場合、活性ウイルス陰性と判定する。検体に活性ウイルスを認めてはならない。

3.2.3 抗原含有量試験

3.2.3.1 試験材料

検体、参照抗原 1（付記 1）、陰性対照（付記 2）及び陽性対照 1（付記 3）、抗 PCV2ORF2 豚 IgG（付記 4）、抗 PCV2ORF2 モノクローナル抗体（付記 5）及び酵素標識抗体（付記 6）を用いる。

3.2.3.2 試験方法

3.2.3.2.1 固相化プレートの作製

抗 PCV2ORF2 豚 IgG を吸着用緩衝液（付記 7）で 5,000 ~ 6,000 倍に希釈したものを 100 μL ずつ 96 穴 ELISA プレートに分注し、35 ~ 39 °C で一夜静置する。洗浄・希釈液（付記 8）で 3 回洗浄し、ブロッキング液（付記 9）を 250 μL ずつ加え、35 ~ 39 °C で 60 分間反応させる。このプレートを洗浄・希釈液で 3 回洗浄し、固相化プレートとする。

3.2.3.2.2 試料等の調製

検体、参照抗原 1、陰性対照及び陽性対照 1 を洗浄・希釈液でそれぞれ 30 倍から 3 倍階段希釈した各段階の希釈液を試料とする。

3.2.3.2.3 反応

各試料 100 μL ずつを固相化プレートの 3 穴に加え、35 ~ 39 °C で 60 分間反応させる。反応後、各穴を洗浄液で 3 回洗浄する。洗浄・希釈液で 300 倍に希釈した抗 PCV2ORF2 モノクローナル抗体を各穴に 100 μL ずつ分注し、35 ~ 39 °C で 60 分間反応させる。反応後、各穴を洗浄・希釈液で 3 回洗浄する。1 vol % ウサギ血清加希釈用緩衝液（付記 10）で 5,000 ~ 20,000 倍に希釈した酵

素標識抗体を各穴に 100 μ L ずつ分注し、35 ~ 39 $^{\circ}$ C で 45 分間反応させる。反応後、各穴を洗浄・希釈液で 3 回洗浄する。基質液（付記 11）を 100 μ L ずつ各穴に分注し、室温で 15 分間反応させる。その後、1 mol/L 塩酸溶液を 100 μ L ずつ各穴に分注し、反応を停止させる。

3.2.3.2.4 吸光度測定

波長 450nm で吸光度を測定する。

3.2.3.3 判定

参照抗原 1 の力価を 1.0 として、検体の相対力価を統計学的計算方法（付記 12）により算出する。このとき、検体の相対力価は、1.0 以上でなければならない。また、陽性対照 1 の 270 倍希釈液の平均吸光度は 0.838 以上であり、陰性対照の 30 倍希釈液の平均吸光度は 0.2 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、透明からやや混濁した無色から帯黄色、粘性のない液体でなければならない。異物及び異臭を認めてはならない。小分容器ごとの性状は、均一でなければならない。

3.3.2 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、その試験方法とする。

3.3.3 pH 測定試験

一般試験法の pH 測定試験を準用して試験するとき、pH は、固有の値を示さなければならない。

3.3.4 安全試験

3.3.4.1 試験材料

3.3.4.1.1 注射材料

試験品を注射材料とする。

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 2 頭分ずつを 2 頭の試験動物の頸部筋肉内に注射し、21 日間観察する。

3.3.4.3 判定

観察期間中、試験動物に異常を認めてはならない。

3.3.5 力価試験

3.3.5.1 試験材料

試験品、参照抗原 2（参照ワクチン）（付記 13）、陰性対照、陽性対照 2（付記 14）、抗 PCV2ORF2 豚 IgG、抗 PCV2ORF2 モノクローナル抗体及び酵素標識抗体を用いる。

3.3.5.2 試験方法

3.3.5.2.1 固相化プレートの作製

3.2.3.2.1 を準用して作製する。

3.3.5.2.2 試料等の調製

試験品、参照抗原 2（参照ワクチン）、陰性対照及び陽性対照 2 を洗浄・希釈液でそれぞれ 30 倍から 2 倍階段希釈した各段階の希釈液を試料とする。

3.3.5.2.3 反応

3.2.3.2.3 を準用して行う。

3.3.5.2.4 吸光度測定

波長 450nm で吸光度を測定する。

3.3.5.3 判定

参照抗原 2 (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により算出するとき、試験品の相対力価は、1.0 ~ 3.75 でなければならない。また、陽性対照 2 の 480 倍希釈液の平均吸光度は 0.988 ~ 2.500、陰性対照の 30 倍希釈液の平均吸光度は 0.124 以下でなければならない。

付記 1 参照抗原 1

ワクチンの製造方法で製造されたもので、PCV2ORF2 抗原として約 8 μ g/mL 含むもの。

更新する場合には、元の参照抗原 1 に対する相対力価を求めておき、原液の相対力価測定時には元の参照抗原 1 と同等の抗原量となるよう調製する。

付記 2 陰性対照

Spodoptera frugiperda 細胞培養液にワクチンのアジュバントを 20vol %含むもの

付記 3 陽性対照 1

ワクチンの製造方法で製造されたもので、参照抗原 1 に対する相対力価 4.45 の PCV2ORF2 抗原液 31mL に対して生理食塩液 9 mL を加えたもの。

更新する場合には、元の陽性対照 1 との相対力価が統計的に同等になるよう調製する。

付記 4 抗 PCV2ORF2 豚 IgG

ワクチンで免疫した CDCD (帝王切開由来初乳未摂取) 豚血清から精製した抗 PCV2ORF2 豚 IgG であって、間接蛍光抗体価が 1,500 倍以上のもの。

付記 5 抗 PCV2ORF2 モノクローナル抗体

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細胞 6C4-2-4A3-5D10 の培養上清

付記 6 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 7 吸着用緩衝液

1,000mL 中

炭酸水素ナトリウム 2.93 g

炭酸ナトリウム (無水) 1.59 g

水 残 量

pH を 9.5 ~ 9.7 に調整する。

付記 8 洗浄・希釈液

1,000mL 中

塩化ナトリウム 8.0 g

塩化カリウム 0.2 g

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

ポリソルベート 20 0.5 mL

水 残 量

pH を 7.2 ~ 7.4 に調整する。

付記9 ブロッキング液

洗浄・希釈液に脱脂粉乳を 5.0 w/v %になるように加えたもの

付記10 1 vol %ウサギ血清加希釈用緩衝液

洗浄・希釈液に兎正常血清を 1 vol %になるように加えたもの

付記11 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

B 液：クエン酸緩衝液に 0.02vol %過酸化水素水を含む液
使用時に A 液と B 液を等量混合して用いる。

付記12 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13 参照抗原2（参照ワクチン）

「豚サーコウイルス（2型・組換え型）感染症（カルボキシビニルポリマー加）不活化ワクチン」であって、動物医薬品検査所が適当と認めたもの。

参照抗原1に対する相対力価 4.45 の PCV2ORF2 抗原液を 52%、アジュバントを 20%及び生理食塩液を 28%含む。

更新する場合は、相対力価が 1.0 であり、元の参照抗原2と同等の免疫原性を確認したものとする。

付記14 陽性対照2

参照抗原1に対する相対力価 4.45 の PCV2ORF2 抗原液を 80vol %及びアジュバントを 20vol %含むもの。

更新する場合は、元の陽性対照2との相対力価が統計的に同等になるよう調製する。