

# 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（シード）

平成30年9月11日（告示第2046号）新規追加  
令和2年2月5日（告示第231号）一部改正  
令和2年6月30日（告示第1246号）一部改正

## 1 定義

シードロット規格に適合した組換え豚サーコウイルス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。）遺伝子挿入バキュロウイルスを同規格に適合した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。

## 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）BacPCV2-Orf2;98-99株又はこれと同等と認められた株

#### 2.1.2 性状

Sf21細胞（付記1）で増殖する。PCV2ORF2特異的プライマーを用いて増幅したDNA断片の塩基配列は、核酸を供与した豚サーコウイルス2型と同じである。

#### 2.1.3 マスターシードウイルス

##### 2.1.3.1 作製、保存及び小分製品までの最高継代数

マスターシードウイルスは、Sf21細胞で増殖させ、連続した工程により作製し、保存用の容器に分注する。

分注したマスターシードウイルスは、特定の製造番号又は製造記号を付し、凍結して $-70^{\circ}\text{C}$ 以下又は凍結乾燥して $5^{\circ}\text{C}$ 以下で保存する。

マスターシードウイルスについて、3.1.1の試験を行う。

マスターシードウイルスは、ワクチンの製造以外の目的で継代しない。

マスターシードウイルス から小分製品までの最高継代数は、5代以内でなければならない。

#### 2.1.4 ワーキングシードウイルス

##### 2.1.4.1 増殖、継代及び保存

ワーキングシードウイルスは、Sf21細胞で増殖及び継代する。

ワーキングシードウイルスは、凍結して $-70^{\circ}\text{C}$ 以下又は凍結乾燥して $5^{\circ}\text{C}$ 以下で保存する。

ワーキングシードウイルスについて、3.1.2の試験を行う。

#### 2.1.5 プロダクションシードウイルス

##### 2.1.5.1 増殖及び保存

プロダクションシードウイルスは、Sf21細胞で増殖させる。

プロダクションシードウイルスは、凍結して $-70^{\circ}\text{C}$ 以下又は凍結乾燥して $5^{\circ}\text{C}$ 以下で保存する。

プロダクションシードウイルスを保存する場合には、3.1.3の試験を行う。

## 2.2 製造用材料

### 2.2.1 培養細胞

Sf21細胞を用いる。

### 2.2.2 培養液

製剤ごとに農林水産大臣が適当と認めた培養液を用いる。

## 2.2.3 マスターセルシード

### 2.2.3.1 作製、保存及びプロダクションセルシードまでの最高継代数

マスターセルシードは、2.2.2の培養液で増殖させ、連続した工程により作製し、保存用の容器に分注する。

分注したマスターセルシードは、特定の製造番号又は製造記号を付し、 $-70^{\circ}\text{C}$ 以下で保存する。マスターセルシードについて、3.2.1の試験を行う。

マスターセルシードは、ワクチンの製造又は試験以外の目的で継代しない。

マスターセルシードからプロダクションセルシードまでの最高継代数は、20代以内でなければならない。

## 2.2.4 ワーキングセルシード

### 2.2.4.1 増殖、継代及び保存

ワーキングセルシードは、2.2.2の培養液で増殖及び継代する。

ワーキングセルシードは、凍結して $-70^{\circ}\text{C}$ 以下で保存する。

ワーキングセルシードについて、3.2.2の試験を行う。

## 2.2.5 プロダクションセルシード

### 2.2.5.1 増殖及び保存

プロダクションセルシードは、2.2.2の培養液で増殖させる。

プロダクションセルシードを保存する場合は、凍結して $-70^{\circ}\text{C}$ 以下で保存する。

プロダクションセルシードを保存する場合は、3.2.3の試験を行う。

## 2.3 原液

### 2.3.1 プロダクションセルシードの培養

1回に処理し、培養した細胞を個別培養細胞とみなす。ウイルス接種前の製造用細胞に異常を認めてはならない。

### 2.3.2 ウイルスの培養

プロダクションシードウイルスを2.3.1の細胞で培養し、ウイルスの増殖極期の培養液を超音波処理したものを不活化前原液とする。

不活化前原液について、3.3の試験を行う。

### 2.3.3 不活化

不活化前原液に製剤ごとに農林水産大臣が適当と認めた不活化剤を加えて不活化し、遠心した上清を原液とする。

原液について、3.4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、3.5の試験を行う。

## 3 試験法

### 3.1 製造用株の試験

#### 3.1.1 マスターシードウイルスの試験

##### 3.1.1.1 同定試験

シードロット規格の1.4.2.3.1.1を準用して試験するとき、適合しなければならない。

##### 3.1.1.2 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、適合しなければならない。

##### 3.1.1.3 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。

##### 3.1.1.4 外来性ウイルス否定試験

#### 3.1.1.4.1 共通ウイルス否定試験

一般試験法の外来性ウイルス否定試験法の1.1、2.1及び2.2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。

#### 3.1.1.4.2 特定ウイルス否定試験

##### 3.1.1.4.2.1 特定ウイルス否定一般試験

豚繁殖・呼吸障害症候群ウイルスについて、一般試験法の外来性ウイルス否定試験法の1.1及び3.1.1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。

##### 3.1.1.4.2.2 個別ウイルス否定試験

豚熱ウイルス、豚サーコウイルス、牛ウイルス性下痢ウイルス、ロタウイルス、日本脳炎ウイルス及び狂犬病ウイルスについて、一般試験法の外来性ウイルス否定試験法の1.1、3.2.3、3.2.4、3.2.5、3.2.7及び3.2.9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。

#### 3.1.1.5 組換え遺伝子等安定性確認試験

一般試験法の組換え遺伝子安定性確認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。

#### 3.1.2 ワーキングシードウイルスの試験

##### 3.1.2.1 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。

##### 3.1.2.2 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。

#### 3.1.3 プロダクションシードウイルスの試験

##### 3.1.3.1 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。

##### 3.1.3.2 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。

#### 3.2 株化細胞の試験

##### 3.2.1 マスターセルシードの試験

###### 3.2.1.1 培養性状試験

シードロット規格の2.1.4.2.1.1を準用して試験するとき、適合しなければならない。

###### 3.2.1.2 起源動物種同定試験

シードロット規格の2.1.4.2.1.2を準用して試験するとき、適合しなければならない。

###### 3.2.1.3 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。

###### 3.2.1.4 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。

##### 3.2.1.5 外来性ウイルス否定試験

###### 3.2.1.5.1 共通ウイルス否定試験

一般試験法の外来性ウイルス否定試験法の1.2、2.1及び2.2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。

###### 3.2.1.5.2 特定ウイルス否定試験

###### 3.2.1.5.2.1 特定ウイルス否定一般試験

豚繁殖・呼吸障害症候群ウイルスについて、一般試験法の外来性ウイルス否定試験法の1.2及び3.1.1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。

###### 3.2.1.5.2.2 個別ウイルス否定試験

豚熱ウイルス、豚サーコウイルス、牛ウイルス性下痢ウイルス、ロタウイルス、日本脳炎ウイルス及び狂犬病ウイルスについて、一般試験法の外来性ウイルス否定試験法の1.2、3.2.3、3.2.4、3.2.5、3.2.7及び3.2.9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。

#### 3.2.1.6 核学的（染色体）性状試験

シードロット規格の2.1.4.2.1.6.1を準用して試験するとき、適合しなければならない。

#### 3.2.1.7 腫瘍形成性/腫瘍原性試験

シードロット規格の2.1.4.2.1.7を準用して試験するとき適合しなければならない。

#### 3.2.2 ワーキングセルシードの試験

##### 3.2.2.1 培養性状試験

シードロット規格の2.1.4.2.2.1を準用して試験するとき、適合しなければならない。

##### 3.2.2.2 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、適合しなければならない。

##### 3.2.2.3 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。

#### 3.2.3 プロダクションセルシードの試験

##### 3.2.3.1 培養性状試験

シードロット規格の2.1.4.2.3.1を準用して試験するとき、適合しなければならない。

##### 3.2.3.2 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、適合しなければならない。

##### 3.2.3.3 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。

#### 3.3 不活化前原液の試験

##### 3.3.1 ウイルス含有量試験

###### 3.3.1.1 試験材料

###### 3.3.1.1.1 試料

検体をSf9細胞（付記2）で10倍階段希釈し、各段階の希釈液を試料とする。

###### 3.3.1.1.2 培養細胞

Sf9細胞を用いる。

###### 3.3.1.2 試験方法

試料0.1mLずつをそれぞれ96穴マイクロプレートの4穴以上に分注し、28°Cで5日間培養する。培養後、96vol%冷エタノールで固定し、蛍光抗体法を用いて特異蛍光の有無を観察する。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。

###### 3.3.1.3 判定

特異蛍光を認めたものを感染とみなし、TCID<sub>50</sub>を算出する。

検体のウイルス含有量は、1 mL中10<sup>7.0</sup>TCID<sub>50</sub>以上でなければならない。ただし、農林水産大臣が特に認めた場合には、そのウイルス含有量とする。

#### 3.4 原液の試験

##### 3.4.1 不活化試験

###### 3.4.1.1 試験材料

###### 3.4.1.1.1 試料

検体を試料とする。ただし、農林水産大臣が特に認めた場合には、その試料とする。

###### 3.4.1.1.2 培養細胞

Sf9細胞を用いる。

###### 3.4.1.2 試験方法

試料をローラーボトルに単層を形成した培養細胞に25mLずつ接種し、28°Cで60分間吸着した後、ウイルス増殖用培養液を加え、28°Cで3～4日間培養後、接種した培養細胞を継代し、更に28°Cで10～11日間培養し、観察する。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。

#### 3.4.1.3 判定

培養細胞にCPEを認めてはならない。ただし、農林水産大臣が特に認めた場合には、その判定方法とする。

#### 3.4.2 抗原定量試験

##### 3.4.2.1 試験材料

###### 3.4.2.1.1 試料

検体を希釈液（付記3）で5,000倍に希釈し、試料とする。ただし、農林水産大臣が特に認めた場合には、その試料とする。

###### 3.4.2.2 試験方法

モノクローナル抗体吸着プレート（付記4）に希釈液を100 $\mu$ Lずつ全穴に加える。試料、参照陽性抗原（付記5）及び参照標準抗原（付記6）各200 $\mu$ Lを希釈液で1.5倍階段希釈し、37 $^{\circ}$ Cで60分反応させる。一部、希釈液のみのブランク対照を設定する。反応後、洗浄液（付記7）で洗浄し、ビオチン標識化PCV2特異的モノクローナル抗体（付記8）100 $\mu$ Lを各穴に加える。37 $^{\circ}$ Cで60分間反応後、洗浄液で洗浄し、ペルオキシダーゼ標識アビジン液（付記9）100 $\mu$ Lを各穴に加える。37 $^{\circ}$ Cで45分間反応後、洗浄液で洗浄し、基質液（付記10）を各穴に100 $\mu$ Lずつ加え、常温で反応させた後、2 mol/L硫酸を各穴に50 $\mu$ Lずつ加え、反応を停止させ、波長450nmで吸光度を測定する。参照陽性抗原の吸光度から検量線を作成し、これから試料の抗原の単位を算出する。このとき、ブランク対照の平均吸光度は、0.05以下でなければならない。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。

###### 3.4.2.3 判定

試料中のELISA抗原価は、5,000単位/mL以上でなければならない。ただし、農林水産大臣が特に認めた場合には、その抗原量とする。

#### 3.4.3 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。

#### 3.5 小分製品の試験

##### 3.5.1 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、上層は、乳白色、不透明及び水様の懸濁液であり、底面に淡黄褐色の沈殿物を認める。攪拌後は、乳白色、不透明及び水様の懸濁液となる。また、異物及び異臭を認めてはならず、小分容器ごとの性状は均一でなければならない。

##### 3.5.2 pH測定試験

一般試験法のpH測定試験法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。

##### 3.5.3 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。

##### 3.5.4 アジュバント定量試験

###### 3.5.4.1 酢酸トコフェロール定量試験

日本薬局方のトコフェロール酢酸エステル定量法を準用して試験するとき、酢酸トコフェロールの含有量は、1 mL中11.8mg～13.2mgでなければならない。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。

###### 3.5.4.2 軽質流動パラフィン定量試験

試験品の全量を乾燥させた活性アルミナ約50gを充てんしたガラスカラムに吸着させた後、約250mLのn-ヘキサンを流す。n-ヘキサンを留去後、残留分の質量から軽質流動パラフィンの含有量

を求めるとき、軽質流動パラフィンの含有量は、1 mL中155mg～191mgでなければならない。

### 3.5.5 毒性限度確認試験

一般試験法の毒性限度確認試験法1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、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。

### 3.5.6 力価試験

3.5.6.1又は3.5.6.2のいずれかを実施する。

#### 3.5.6.1 鶏を用いた試験

##### 3.5.6.1.1 試験材料

###### 3.5.6.1.1.1 注射材料

試験品2 mLをプラセボ（付記11）で4倍に希釈したものを注射材料とする。

###### 3.5.6.1.1.2 試験動物

生ワクチン製造用材料の規格1.1由来の3～4週齢の鶏を用いる。ただし、農林水産大臣が特に認めた場合には、その規格の鶏を用いる。

###### 3.5.6.1.2 試験方法

試験動物10羽を試験群、5羽を対照群とする。注射材料0.1mLを試験群の筋肉内に注射する。対照群にはプラセボを筋肉内注射する。注射時及び注射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12）の12列目を除く各穴に希釈液を100 $\mu$ Lずつ分注し、非働化した各被検血清を50 $\mu$ 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13）を50 $\mu$ 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14）及び参照陰性血清（付記15）をそれぞれ12列目の4穴に100 $\mu$ 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、洗浄液で洗浄し、ビオチン標識化PCV2特異モノクローナル抗体を各穴に100 $\mu$ Lずつ加え、37 $^{\circ}$ Cで60分間反応させる。洗浄液で洗浄し、ペルオキシダーゼ標識アビジン液を各穴に100 $\mu$ Lずつ加え、37 $^{\circ}$ Cで45分間反応させる。洗浄液で洗浄し、基質液を各穴に100 $\mu$ Lずつ加え、常温、暗所で反応させた後、2 mol/L硫酸を各穴に50 $\mu$ 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（log<sub>2</sub>）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

###### 3.5.6.1.3 判定

試験動物の注射28日後の抗体価の平均値は4.5log<sub>2</sub>以上でなければならない。対照群の注射28日後の抗体価の平均値は2.0log<sub>2</sub>以下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ない。参照標準血清の抗体価は8.0log<sub>2</sub>～10.0log<sub>2</sub>を示さなければならない。

#### 3.5.6.2 モルモットを用いた試験

##### 3.5.6.2.1 試験材料

###### 3.5.6.2.1.1 注射材料

試験品を注射材料とする。

###### 3.5.6.2.1.2 試験動物

体重約350gのモルモットを用いる。

#### 3.5.6.2.1 試験方法

試験動物10匹を試験群、5匹を対照群とする。注射材料0.25mLずつを試験群の筋肉内に注射し、注射28日後に得られた各個体の血清について3.5.6.1.2を準用したELISAにより抗体価を測定する。対照群は無接種とする。

#### 3.5.6.2.2 判定

試験群の抗体価の平均値は $6.2\log_2$ 以上でなければならない。対照群の抗体価の平均値は $2.0\log_2$ 以下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ない。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 Sf21細胞

*Spodoptera frugiperda* 卵巣由来細胞

#### 付記2 Sf9細胞

*Spodoptera frugiperda* 卵巣由来細胞でSf21細胞のサブクローン

#### 付記3 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4 モノクローナル抗体吸着プレート

PCV2特異的モノクローナル抗体3/1B4 (付記16) をモノクローナル抗体希釈液 (付記17) で蛋白量として100ng/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  $\mu$ Lずつ分注し、2~8°Cで16~24時間静置し、洗浄液300  $\mu$ Lで4回洗浄後、カゼイン緩衝液 (付記18) を200  $\mu$ Lずつ分注し、37°Cで1~2時間静置したもの。

#### 付記5 参照陽性抗原

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、この項において「ワクチン」という。) と同じ方法で製造したPCV2のORF2蛋白で、PCV2ORF2抗原の含有量がELISA抗原価5,000単位/mL以上のもの。

ポリアクリルアミドゲル電気泳動した場合、約28kDaに特異的なバンドを認め、また、3.3.2.2を準用したELISAにより波長450nmの吸光度を測定した場合、吸光度1.000以上を示すもの。

#### 付記6 参照標準抗原

ワクチンと同じ方法で製造したPCV2のORF2蛋白で、PCV2ORF2抗原の含有量がELISA抗原価5,000単位/mLと規定したもの。

ポリアクリルアミドゲル電気泳動した場合、約28kDaに特異的なバンドを認め、また、3.3.2.2を準用したELISAにより波長450nmの吸光度を測定した場合、吸光度1.000以上を示すもの。

#### 付記7 洗浄液

1,000mL 中	
無水リン酸水素二ナトリウム	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8 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9 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、希釈液で希釈して用いる。

付記10 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pH5.5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 6 gをジメチルスルホキシド1,000mLで溶解したもの。

付記11 プラセボ  
ワクチンの成分のうち、主剤を基礎培地に置き換え、その他のアジュバント等の添加剤は、ワクチンと同一成分、同一分量に調製したもの。

付記12 抗原吸着プレート  
PCV2特異的モノクローナル抗体3/1B4をモノクローナル抗体希釈液で蛋白量として100ng/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  $\mu$ Lずつ分注し、2～8℃で16～24時間静置し、洗浄液300  $\mu$ Lで4回洗浄後、カゼイン緩衝液を200  $\mu$ Lずつ分注し、37℃で1～2時間静置し、洗浄液300  $\mu$ Lで4回洗浄する。さらに、PCV2ORF2抗原（付記19）を希釈液で蛋白量として4  $\mu$ g/mLになるように希釈し、100  $\mu$ Lずつ分注し、37℃で1時間静置し、洗浄液300  $\mu$ Lで4回洗浄したもの。

付記13 参照標準血清  
ワクチンで免疫した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、3.4.7.1.2を準用したELISA（以下、この項において「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14 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15 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16 PCV2特異的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ークロマトグラフィーで精製し、1 mL中蛋白量として600  $\mu$ gになるように調整したもの。

付記17 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18 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19 PCV2ORF2抗原

ワクチンと同じ方法で製造したPCV2ORF2蛋白抗原を不活化したもので、1 mL中蛋白量として200  $\mu$ gになるように調整したもの。ポリアクリルアミドゲル電気泳動した場合、約28kDaに特異的なバンドを認めるもの。