

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）

令和3年5月17日(告示第798号)新規追加

1 定義

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合して調製するワクチンである。

2 製法

2.1 製造用株

2.1.1 名称

豚サーコウイルス（2型）（以下この項において「PCV2」という。）1010-25株又はこれと同等と認められた株

2.1.2 性状

PK15細胞で増殖する。PCV2に対する抗体を産生させる免疫原性を有する。

2.1.3 継代及び保存

原株及び種ウイルスは、PK15細胞又は適当と認められた培養細胞で継代する。原液は、原株から7代以内に製造しなければならない。

原株及び種ウイルスは、凍結して -70°C 以下又は凍結乾燥して 5°C 以下で保存する。

2.2 製造材料

2.2.1 培養細胞

PK15細胞又は製造に適当と認められた培養細胞を用いる。

2.2.1.2 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、必要に応じて、超音波処理による培養細胞の破碎、ろ過及び遠心分離を行ったものをウイルス浮遊液とする。

2.3.3 不活化

ウイルス浮遊液に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、適当と認められた中和剤を加えて中和したものを不活化ウイルス液とする。

不活化ウイルス液について、3.1の試験を行う。

2.3.4 原液

不活化ウイルス液を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。

2.4 最終バルク

原液に適量の保存剤を添加し、適当と認められた溶液で濃度調整したものを最終バルクとする。

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 不活化ウイルス液の試験

3.1.1 不活化試験

3.1.1.1 試験材料

3.1.1.1.1 試料

検体を試料とする。

3.1.1.1.2 培養細胞

PPK-3F細胞又は適当と認められた培養細胞を用いる。

3.1.1.2 試験方法

試料及びPCV2参照ウイルス（付記1）6.6mL以上をそれぞれ300cm²以上の培養細胞に接種し、37°Cで1日培養後グルコサミン処理培地（付記2）を30mL加え、37°Cで15分間静置した後、上清を除去し、ウイルス継代培養液（付記3）を加え、3日間培養する。この培養細胞を凍結融解し、遠心して得た上清について、培養細胞300cm²当たり60mLを同様に接種、培養する。これを同様に凍結融解、遠心して得た上清を2倍及び5倍に希釈し、その0.1mLずつを培養細胞に加え、37°Cで4日間培養した細胞について、PCV2モノクローナル抗体（付記4）による蛍光抗体法を行う。

3.1.1.3 判定

試料を接種した培養細胞には特異蛍光抗原を認めてはならない。この際、PCV2参照ウイルスを接種した培養細胞には特異蛍光抗原を認めなければならない。

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。

3.2.2 抗原定量試験

3.2.2.1 試験材料

3.2.2.1.1 試料

検体を試料とする。

3.2.2.2 試験方法

固相化プレート（付記5）の各穴にELISA用緩衝液（付記6）で2倍階段希釈した参照抗原（付記7）及び試料を100μLずつ分注し、37°Cで3時間反応させた後、洗浄液（付記8）で洗浄する。各穴に抗原定量ELISA用標識抗体（付記9）を100μL加え、37°Cで1時間反応後、洗浄液で洗浄する。基質液（付記10）を100μLずつ加え、遮光して20°C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を算出し、OD₅₀を示す試料の希釈倍数を抗原量（ELISA単位）とする。

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

ODmin：参照抗原の最小OD

ODmax：参照抗原の最大OD

3.2.2.3 判定

参照抗原が所定の抗原量を示すとき、試料の抗原量は $10^{2.6}$ ELISA単位/mL以上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、固有の色調を有する均一な液体でなければならない。懸濁用液と混和したものは、固有の色調を有する均一な乳液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 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。

3.3.3 チメロサル定量試験

一般試験法のチメロサル定量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。

3.3.4 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。

3.3.5 異常毒性否定試験

一般試験法の異常毒性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。

3.3.6 力価試験

3.3.6.1 試験材料

3.3.6.1.1 注射材料

試験品を注射材料とする。

3.3.6.1.2 試験動物

6～7週齢のマウスを用いる。

3.3.6.2 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。

DLE/SD緩衝液（付記11）で5倍に希釈した各被検血清及び参照陰性血清（付記12）を、DLE/SD緩衝液で2倍階段希釈する。参照陽性血清（付記13）はその抗体価に応じて希釈したものを同様に2倍階段希釈する。各希釈血清と抗原液（付記14）を等量混合し、4℃で一夜静置する。この抗原・抗体反応液100 μ Lずつを固相化プレート2（付記15）の各穴に加え、37℃で3時間反応させる。洗浄液で洗浄し、抗体価測定ELISA用標識抗体（付記16）を各穴に100 μ Lずつ加え、37℃で60分間反応させる。洗浄液で洗浄し、各穴に基質液を100 μ L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50 μ L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数を抗体価とする。

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

ODmin：参照陽性血清の最低希釈倍数におけるODの平均

ODmax：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

3.3.6.3 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。

4 貯法及び有効期間

有効期間は、製造後2年間とする。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 PCV2参照ウイルス

PCV2 1010株又はこれと同等と認められたウイルス株で、200TCID₅₀に調整したもの

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 ウイルス継代培養液

1,000mL中

牛胎子血清 50 mL

ダルベッコ変法イーグルMEM (付記17) 残量

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 (以下この項において「PCV2ORF2」という。)を認識するモノクローナル抗体

付記5 固相化プレート

炭酸ナトリウム緩衝液 (付記18) で希釈した抗原定量ELISA用捕捉抗体 (付記19) を96穴ELISAプレートに分注し、固相化したもの

付記6 ELISA用緩衝液

1,000mL中

トリスヒドロキシメチルアミノメタン 2.43 g

塩化ナトリウム 8.77 g

牛血清アルブミン 10.0 g

ポリソルベート	0.5 mL
水	残 量

pHを7.4に調整する。

付記7 参照抗原

PK15細胞又は適当と認められた培養細胞で培養したPCV2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、3.2.2 抗原定量試験で測定するとき、所定の抗原量を示すもの

付記8 洗浄液

1,000mL中	
塩化ナトリウム	8.77 g
トリスヒドロキシメチルアミノメタン	1.21 g
ポリソルベート	1 mL
水	残 量

pHを7.3～7.7に調整する。

付記9 抗原定量ELISA用標識抗体

ハイブリドーマPCV2 1903A8BCの産生するPCV2ORF2に特異的なモノクローナル抗体で、ELISA用緩衝液で希釈して用いる。

付記10 基質液

適当な品質の3,3',5,5'-テトラメチルベンジジン溶液

付記11 DLE/SD緩衝液

1,000mL中	
トリスヒドロキシメチルアミノメタン	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12 参照陰性血清

マウスから得られた血清で、3.3.6.2を準用したELISAで測定したとき、抗体価が検出限界以下のもの

付記13 参照陽性血清

マウスをPCV2不活化ワクチンで2回免疫後35日目に得られた血清で、3.3.6.2を準用したELISAで測定したとき、所定の抗体価を示すもの

付記14 抗原液

PK15細胞で培養したPCV2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

付記15 固相化プレート2

抗体価測定ELISA用捕捉抗体（付記19）を $120\mu\text{L}$ ずつ96穴ELISAプレートに分注し、 4°C 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20）を $200\mu\text{L}$ ずつ加え、 37°C で60分間反応させ、洗浄液で3回洗浄したもの

付記16 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、15w/v%サッカリン加リン酸緩衝食塩液で調整したもので、炭酸ナトリウム緩衝液で希釈して用いる。

付記17 ダルベッコ変法イーグルMEM

市販の適当な品質の液状製品、又は乾燥製品を記載に従って溶かし、滅菌したものをを用いる。

付記18 炭酸ナトリウム緩衝液

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に調整する。

付記19 抗原定量ELISA用捕捉抗体

ハイブリドーマPCV2 1902B1BCの産生するPCV2ORF2に特異的なモノクローナル抗体で、炭酸ナトリウム緩衝液で希釈して用いる。

付記20 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1w/v%加えたもの