

# 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

平成29年1月19日(告示第89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「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、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株又は適当と認められた株

#### 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 継代及び保存

原株及び種ウイルスは、Sf21細胞又は適当と認められた培養細胞で継代する。

継代は、原株にあっては3代以内、種ウイルスにあっては2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 $-70^{\circ}\text{C}$ 以下又は凍結乾燥して $5^{\circ}\text{C}$ 以下で保存する。

### 2.2 製造用材料

#### 2.2.1 培養細胞

Sf21細胞又は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。

個別培養細胞について、3.1の試験を行う。

#### 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、3.2の試験を行う。

#### 2.3.4 不活化

原液に2-ブロモエチルアミン臭化水素酸塩又は適当と認められ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、3.3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、3.4の試験を行う。

## 3 試験法

### 3.1 培養細胞の試験

個体別培養細胞の一部を対照培養細胞とし、これについて次に掲げる試験を行う。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 培養観察

対照培養細胞を、ウイルスを接種することなく、ウイルスの培養と同じ条件で培養する。対照培養細胞をプールし、4本以上の培養びん及びカバーグラスを入れた4枚以上のシャーレに継代し、5～7日間培養し、観察するとき、CPEを認めてはならない。

#### 3.1.2 赤血球吸着試験

3.1.1の試験最終日に培養びんの培養液を除き、リン酸緩衝食塩液で細胞表面を2回洗浄したのち、鶏、ヒト及びモルモットの赤血球濃度がそれぞれ1.0vol%になるように調整した赤血球混合液を重層し、60分間静置した後、赤血球吸着の有無を観察するとき、培養細胞に赤血球吸着を認めてはならない。

### 3.2 不活化前原液の試験

#### 3.2.1 ウイルス含有量試験

##### 3.2.1.1 試験材料

###### 3.2.1.1.1 試料

検体をSF9細胞（付記2）を浮遊させた適当と認められたウイルス増殖用培養液で10倍階段希釈し、各段階の希釈液を試料とする。

###### 3.2.1.1.2 培養細胞

SF9細胞又は適当と認められた細胞を用いる。

###### 3.2.1.2 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。

###### 3.2.1.3 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。

### 3.3 原液の試験

#### 3.3.1 不活化試験

##### 3.3.1.1 試験材料

###### 3.3.1.1.1 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。

#### 3.3.1.1.2 培養細胞

SF9細胞又は適当と認められた培養細胞を用いる。

#### 3.3.1.2 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℃で60分間吸着した後、ウイルス増殖用培養液を加え、28℃で3～4日間培養後、接種した培養細胞を継代し、更に28℃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。

#### 3.3.1.3 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。

### 3.3.2 抗原定量試験

#### 3.3.2.1 試験材料

##### 3.3.2.1.1 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。

##### 3.3.2.2 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℃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）300 $\mu$ Lで4回洗浄し、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℃で60分間反応後、洗浄液300 $\mu$ Lで4回洗浄し、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℃で45分間反応後、洗浄液300 $\mu$ Lで8回洗浄し、基質液（付記10）を各穴に100 $\mu$ Lずつ加え、常温で15分間反応させた後、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。

##### 3.3.2.3 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。

### 3.3.3 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。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 小分製品の試験

### 3.4.1 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。

### 3.4.2 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。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。

### 3.4.3 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。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。

### 3.4.4 アジュバント定量試験

#### 3.4.4.1 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。

#### 3.4.4.2 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。

### 3.4.5 安全試験

#### 3.4.5.1 試験材料

##### 3.4.5.1.1 注射材料

試験品を注射材料とする。

##### 3.4.5.1.2 試験動物

約4週齢の豚を用いる。

#### 3.4.5.2 試験方法

試験動物2頭に注射材料4 mLを筋肉内に2週間隔で2回注射し、各注射後14日間観察する。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。

#### 3.4.5.3 判定

注射後、一過性の発熱を認めても2日以内に回復する。また、アナフィラキシー様症状が発現した場合、特に処置することなく数分以内に回復する。その他の異常を認めてはならない。

### 3.4.6 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。

### 3.4.7 力価試験

3.4.7.1又は3.4.7.2のいずれかを実施する。

#### 3.4.7.1 鶏を用いた試験

##### 3.4.7.1.1 試験材料

##### 3.4.7.1.1.1 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。

##### 3.4.7.1.1.2 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

特に認められた場合には、その規格の鶏を用いる。

#### 3.4.7.1.2 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blank対照とする。37 $^{\circ}$ Cで60分間反応させた後、洗浄液300 $\mu$ Lで4回洗浄し、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300 $\mu$ Lで4回洗浄し、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300 $\mu$ Lで8回洗浄し、基質液を各穴に100 $\mu$ Lずつ加え、常温で15分間反応させた後、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%阻止吸光度 = (参照陰性血清の吸光度の平均 - 参照陽性血清の吸光度の平均) / 2

カットオフ吸光度 = 50%阻止吸光度 + 参照陽性血清の吸光度の平均

各血清の抗体価 = log<sub>2</sub> { 吸光度Aを示す各血清の希釈倍数 + (カットオフ吸光度 - 吸光度A / 吸光度B - 吸光度A) × (吸光度Bを示す各血清の希釈倍数 - 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

#### 3.4.7.1.3 判定

試験動物の注射28日後の抗体価の平均値は4.5 log<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2.0 log<sub>2</sub>以下でなければならない。この際、blank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<sub>2</sub> ~ 10.0 log<sub>2</sub>を示さなければならない。

#### 3.4.7.2 モルモットを用いた試験

##### 3.4.7.2.1 試験材料

##### 3.4.7.2.1.1 注射材料

試験品を注射材料とする。

##### 3.4.7.2.1.2 試験動物

体重約350gのモルモットを用いる。

##### 3.4.7.2.2 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3.4.7.1.2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。

##### 3.4.7.2.3 判定

試験群の抗体価の平均値は6.2 log<sub>2</sub>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<sub>2</sub>以下でなければならない。この際、blank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ず、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。

#### 4 貯法及び有効期間

有効期間は、3年間とする。ただし、農林水産大臣が特に認めた場合は、その期間とする。

##### 付記1 Sf21細胞

*Spodoptera fugiperda* 卵巣由来細胞

##### 付記2 Sf9細胞

*Spodoptera fugiperda* 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℃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℃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「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

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
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2,500倍に希釈して用いる。

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pH 5.5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6g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135μLずつ分注し、2～8℃で16～24時間静置し、洗浄液300μLで4回洗浄後、カゼイン緩衝液を200μLずつ分注し、37℃で1～2時間静置し、洗浄液300μL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4μg/mLになるように希釈し、100μLずつ分注し、37℃で1時間静置し、洗浄液300μL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「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クロマトグラフィーで精製し、1 mL中蛋白量として $600 \mu\text{g}$ 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 $200 \mu\text{g}$ 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。