

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・マイコプラズマ・ハイオニューモニエ感染症（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 24 年 8 月 10 日（告示第 2005 号） 新規追加

平成 28 年 1 月 20 日（告示第 96 号） 一部改正

平成 30 年 4 月 27 日（告示第 969 号） 一部改正

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（以下この項において「PCV2 ワクチン」という。）とマイコプラズマ・ハイオニューモニエの培養菌液を不活化し、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（以下この項において「Mhp ワクチン」という。）を組み合わせたワクチンである。

1 小分製品の試験

1.1 無菌試験

PCV2 ワクチンと Mhp ワクチンそれぞれを試験品として一般試験法の無菌試験法により試験を行い、これに適合しなければならない。

1.2 安全試験

1.2.1 試験材料

1.2.1.1 注射材料

PCV2 ワクチンと Mhp ワクチンそれぞれを注射材料とする。

1.2.1.2 試験動物

3 ～ 5 週齢の豚を用いる。

1.2.2 試験方法

注射材料 2 頭分ずつを 2 頭の試験動物の左右の頸部筋肉内にそれぞれ注射し、21 日間観察する。

1.2.3 判定

観察期間中、試験動物に臨床的な異常を認めてはならない。

1.3 力価試験

1.3.1 豚サーコウイルス 2 型感染症力価試験

1.3.1.1 試験材料

PCV2 ワクチン、参照ワクチン（付記 1）、陰性対照（付記 2）、陽性対照（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。

1.3.1.2 試験方法

1.3.1.2.1 酵素抗体反応（以下この項において「ELISA」という。）用固相化プレートの作製

抗 PCV2ORF2 豚 IgG を吸着用緩衝液（付記 7）で希釈したものを 100 μ L ずつ 96 穴 ELISA プレートに分注し、35 ～ 39 $^{\circ}$ C で 1 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 μ L ずつ加え、35 ～ 39 $^{\circ}$ C で 60 分間反応させる。この固相化プレートを洗浄・希釈液で 3 回洗浄し、固相化プレートとする。

1.3.1.2.2 試料等の調整

PCV2 ワクチン、参照ワクチン、陰性対照及び陽性対照を洗浄・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。

1.3.1.2.3 反応

各試料 100 μ L ずつを固相化プレートの 3 穴に加え、35 ～ 39 $^{\circ}$ 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。洗浄・希釈液で希釈した抗 PCV2ORF2 モノクローナル抗体を各穴に 100 μ L ずつ分注し、35 ～ 39 $^{\circ}$ 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、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。

1.3.1.2.4 吸光度測定

波長 450nm で吸光度を測定する。

1.3.1.3 判定

参照ワクチンの力価を 1.0 として、PCV2 ワクチンの相対力価を統計学的計算方法（付記 12）により算出するとき、PCV2 ワクチンの相対力価は、1.0 ～ 3.75 でなければならない。この際、陽性対照の 480 倍希釈液の平均吸光度は 0.998 ～ 2.500 でなければならない、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。

1.3.2 マイコプラズマ・ハイオニューモニエ感染症力価試験

1.3.2.1 試験材料

1.3.2.1.1 注射材料

Mhp ワクチンをワクチン希釈液（付記 13）で 90 倍に希釈した後、更に生理食塩液で 2 倍に希釈したものを注射材料とする。

1.3.2.1.2 試験動物

6 ～ 7 週齢の SPF の ddY 系雌マウスを用いる。

1.3.2.1.3 ELISA 用抗原

固相化抗原（付記 14）を用いる。

1.3.2.2 試験方法

試験動物の 20 匹を試験群、10 匹を対照群とする。

注射材料 0.1mL ずつを試験群の腹部皮下に注射する。注射後 3 週間目に、試験群及び対照群から得られた各個体の血清について、ELISA を行う。

試験群及び対照群の血清並びに参照陽性血清（付記 15）をブロッキング液（付記 16）で 10 倍に希釈したものを、更に同液で 2 倍階段希釈する。これらの血清希釈液を抗原吸着プレート（付記 17）の穴に 100 μ L ずつ加え、ブロッキング液のみの穴を血清対照とする。37 $^{\circ}$ C で 1 時間反応させた後、洗浄液（付記 18）で 3 回洗浄する。次に、ブロッキング液で至適濃度に希釈した酵素標識抗体を各穴に 100 μ L ずつ加え、37 $^{\circ}$ C で 1 時間反応させた後、洗浄液で 3 回洗浄する。その後、基質液を各穴に 100 μ L ずつ加えて反応させた後、各穴に 1 mol/L 塩酸を 100 μ L ずつ加えて反応を停止させ、波長 450nm で吸光度を測定する。

1.3.2.3 判定

血清対照の各穴の吸光度値の平均値に 0.5 を加えた値以上の吸光度値を示した血清の最高希釈倍数を抗体価とする。

試験群では、70 % 以上が抗体価 320 倍以上でなければならない。この場合、対照群では、全て抗体価 20 倍以下でなければならない。また、参照陽性血清は、抗体価 320 ～ 640 倍でなければならない。

- 付記 1 参照ワクチン
PCV2 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。
- 付記 2 陰性対照
Spodoptera frugiperda 細胞培養液に PCV2 ワクチンのアジュバントを 20vol %含むもの。
- 付記 3 陽性対照
PCV2 ワクチンの製造方法で製造されたもので、PCV2ORF2 抗原液を 80vol %及びアジュバントを 20vol %含むもの。
- 付記 4 抗 PCV2ORF2 豚 IgG
PCV2 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 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 5.0w/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・希釈液にウサギ正常血清を 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 ワクチン希釈液

0.5w/v % カルボキシビニルポリマー液（付記 19）を生理食塩液で 5 倍に希釈したもの。

付記 14 固相化抗原

マイコプラズマ・ハイオニューモニエ製造用株又はこれと同等の免疫原性を有する株の培養菌液を遠心集菌し、菌体を洗浄した後、超音波処理をして調製した抗原。

付記 15 参照陽性血清

マイコプラズマ・ハイオニューモニエ製造用株又はこれと同等の免疫原性を有する株の培養菌液を不活化し、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免疫したマウスの血清であって、1.3.2 の試験により抗体価が 320 ～ 640 倍となるように濃度を調整したもの。凍結して - 50 °C 以下で保存する。

付記 16 ブロッキング液

1,000mL 中

スキムミルク

50 g

洗浄液

残 量

必要に応じ、200nm 以下のフィルターでろ過滅菌する。

付記 17 抗原吸着プレート

マイコプラズマ固相化抗原をトリス緩衝食塩液（付記 20）で希釈し、96 穴 ELISA プレートの各穴に 100 μ L ずつ加え、37 °C で 1 時間反応させた後、洗浄液で洗浄する。その後、ブロッキング液を各穴に 100 μ L ずつ加え、37 °C で 1 時間反応させた後、洗浄液で洗浄したもの。

付記 18 洗浄液

1,000mL 中

ポリソルベート 20

0.5 mL

トリス緩衝食塩液

残 量

pH を 7.2 ～ 7.4 に調整する。

付記 19 0.5w/v % カルボキシビニルポリマー液

1,000mL 中

カルボキシビニルポリマー

5 g

水

残 量

pH を 7.2 ～ 7.5 に調整して、121 °C で 30 分間高压滅菌する。

付記 20 トリス緩衝食塩液

1,000mL 中

トリスヒドロキシメチルアミノメタン

2.42 g

塩化ナトリウム

8.77 g

水

残 量

pH を 7.2 ～ 7.4 に調整する。