

豚サーコウイルス（2型・組換え型）感染症・マイコプラズマ・ハイオニューモニエ感染症混合（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 25 年 9 月 26 日(告示第 2481 号)新規追加
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。) を使用時に混合するワクチンである。

1 小分製品の試験

1.1 無菌試験

PCV2 ワクチンと Mhp ワクチンを等量混合したもの (以下この項において「混合ワクチン」という。) について、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

混合ワクチンを注射材料とする。

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半量ずつ注射し、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

1.3.1.1.1 注射材料

混合ワクチンをワクチン希釈液 (付記 1) で 10 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。

1.3.1.1.2 試験動物

6 ~ 7 週齢の SPF の ddY 系雌マウスを用いる。

1.3.1.1.3 ELISA 用抗原

固相化抗原 1 (付記 2) を用いる。

1.3.1.2 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 0.2mL ずつを試験群の腹部皮下に注射する。注射後 4 週間に、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 1 (付記 3) をブロッキング液 (付記 4) 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1（付記5）の穴に $100\ \mu\text{L}$ ずつ加え、ブロッキング液のみの穴を血清対照とする。37℃で1時間反応させた後、洗浄液（付記6）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（付記7）を各穴に $100\ \mu\text{L}$ ずつ加え、37℃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（付記8）を各穴に $100\ \mu\text{L}$ ずつ加えて反応させた後、各穴に1mol/L塩酸を $100\ \mu\text{L}$ ずつ加えて反応を停止させ、波長450nmで吸光度を測定する。

1.3.1.3 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640倍以上でなければならない。この場合において、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、参考陽性血清1は、抗体価640～1280倍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

混合ワクチンをワクチン希釈液で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作成する。

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 酵素抗体反応（以下この項においてELISAという。）用抗原

固相化抗原2（付記9）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0.2mL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考陽性血清2（付記10）をブロッキング液で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2（付記11）の穴に $100\ \mu\text{L}$ ずつ加え、ブロッキング液のみの穴を血清対照とする。37℃で1時間反応させた後、洗浄液で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 $100\ \mu\text{L}$ ずつ加え、37℃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 $100\ \mu\text{L}$ ずつ加えて反応させた後、各穴に1mol/L塩酸を $100\ \mu\text{L}$ 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。この場合において、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、参考陽性血清2は、抗体価320～640倍でなければならない。

付記1 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12）を生理食塩液で5倍に希釈したもの。

付記2 固相化抗原1

適当と認められたクロマトグラフィーによって精製したPCV2ORF2画分。

付記3 参照陽性血清1

試験品で免疫した ddY 系マウスの血清であって、1.3.1 の試験により抗体価が 640 ~ 1280 倍となるように濃度を調整したもの。

付記4 ブロッキング液

洗浄液にスキムミルクを 5.0w/v % になるように加えたもの。

付記5 抗原吸着プレート1

固相化抗原1をトリス緩衝食塩液（付記13）で希釈し、96穴ELISAプレートの各穴に 100 μL ずつ加え、37℃で1時間反応させた後、洗浄液で3回洗浄する。その後、ブロッキング液を各穴に 100 μL ずつ加え、37℃で1時間反応させた後、洗浄液で3回洗浄したもの。

付記6 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7 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8 基質液

3,3',5,5'テトラメチルベンチジンを含むペルオキシダーゼ基質液

付記9 固相化抗原2

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10 参照陽性血清2

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た抗原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℃ 以下で保存する。

付記11 抗原吸着プレート2

固相化抗原2をトリス緩衝食塩液で希釈し、96穴ELISAプレートの各穴に 100 μL ずつ加え、37℃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 μL ずつ加え、37℃で1時間反応させた後、洗浄液で洗浄したもの。

付記12 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℃で 30 分間高圧滅菌する。 | |

付記13 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。