

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）・豚繁殖・呼吸障害症候群・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）混合ワクチン

平成28年1月20日（告示第96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型オーブ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。）、弱毒豚繁殖・呼吸障害症候群ウイルスを培養細胞で増殖させて得たウイルス液を凍結乾燥したワクチン（以下この項において「PRRSワクチン」という。）及びマイコプラズマ・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でPRRSワクチンを溶解したもの（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 ウイルス含有量試験

1.2.1 試験材料

1.2.1.1 試料

PRRSワクチンをウイルス増殖用培養液（付記1）で10倍階段希釈し、各段階の希釈液を試料とする。

1.2.1.2 細胞

MA-104細胞又は適当と認められた培養細胞を96穴プレートに培養し、単層となったものを用いる。

1.2.2 試験方法

試料0.1mLずつをそれぞれ6穴以上の培養細胞に接種し、37℃で8日間培養し観察する。

1.2.3 判定

培養細胞にCPEを認めたものを感染とみなし、TCID₅₀を算出する。

試験品のウイルス含有量は、1頭分当たり $10^{4.9} \sim 10^{6.7}$ TCID₅₀の範囲内でなければならない。

1.3 安全試験

1.3.1 試験材料

1.3.1.1 注射材料

混合ワクチンを注射材料とする。

1.3.1.2 試験動物

3～5週齢の豚を用いる。

1.3.2 試験方法

注射材料 1 頭分ずつを 2 頭の試験動物の筋肉内に注射し、21 日間観察する。

1.3.3 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。

1.4 力価試験

1.4.1 豚サコウイルス 2 型感染症力価試験

1.4.1.1 試験材料

1.4.1.1.1 注射材料

混合ワクチンをワクチン希釈液（付記 2）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。

1.4.1.1.2 試験動物

6 ～ 7 週齢の SPF の ddY 系雌マウスを用いる。

1.4.1.1.3 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 1（付記 3）を用いる。

1.4.1.2 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 1（付記 4）をブロッキング液（付記 5）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 6）の穴に $100 \mu L$ ずつ加え、ブロッキング液のみの穴を血清対照とする。37 °Cで 1 時間反応させた後、洗浄液（付記 7）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 8）を各穴に $100 \mu L$ ずつ加え、37 °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（付記 9）を各穴に $100 \mu L$ ずつ加えて反応させた後、各穴に 1 mol/L 塩酸を $100 \mu L$ ずつ加えて反応を停止させ、波長 450nm で吸光度を測定する。

1.4.1.3 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。

1.4.2 豚繁殖・呼吸障害症候群力価試験

1.4.2.1 試験材料

1.4.2.1.1 試験動物

1.3 の試験に用いた動物を用いる。

1.4.2.1.2 感染細胞

MA-104 細胞を 8 チャンバースライドに 37 °Cで培養し、単層を形成させたものに豚繁殖・呼吸障害症候群ウイルス JJ1882 株を 1 チャンバー当たり $10^{3.5}$ TCID₅₀ 以上接種する。37 °Cで 1 ～ 2 日間培養した後、生理食塩液及び蒸留水で洗浄し、乾燥する。その後、冷アセトン・エタノール（1 : 1）液で固定後乾燥させたものを感染細胞とし、8 °C以下で密封保存する。

1.4.2.2 試験方法

1.3 の試験終了後 7 日目に得られた各個体の血清について、蛍光抗体法を行う。

被検血清を生理食塩液で 20 倍希釈した後、更に 2 倍階段希釈する。感染細胞に各希釈液を加え、37 °Cで 60 分間処理した後、生理食塩液で洗浄し、抗豚 IgG 蛍光標識抗体（付記 10）を加え、37 °Cで 60 分間処理した後、生理食塩液で洗浄し、UV 効起方式で観察する。

1.4.2.3 判定

特異蛍光が認められた血清の最高希釈倍数を抗体価とする。

試験動物の抗体価は、40倍以上でなければならない。

1.4.3 マイコプラズマ・ハイオニューモニエ感染症力価試験

1.4.3.1 試験材料

1.4.3.1.1 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お注射材料とする。

1.4.3.1.2 試験動物

6～7週齢のSPFのddY系雌マウスを用いる。

1.4.3.1.3 ELISA用抗原

固相化抗原2（付記11）を用いる。

1.4.3.2 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照陽性血清2（付記12）をブロッキング液で10倍に希釈したものをお、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13）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℃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 μ 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 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。

1.4.3.3 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、参照陽性血清2は、抗体価320～640倍でなければならない。

付記1 ウイルス増殖用培養液

1,000mL中

牛胎子血清

20～50mL

イーグル MEM

残量

炭酸水素ナトリウムでpHを6.8～7.0に調整する。

必要最小量の抗生物質を加えてもよい。

付記2 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14）を生理食塩液で5倍に希釈したもの。

付記3 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4 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、1.4.1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 5 プロッキング液

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 6 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 15）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 3 回洗浄する。その後、プ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 3 回洗浄したもの。

付記 7 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 8 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 9 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 10 抗豚 IgG 蛍光標識抗体

抗豚 IgG 血清から γ -グロブリンを調製し、これを蛍光色素で標識したもの。

付記 11 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 12 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、1.4.3 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 13 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 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、プ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 14 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 分間高圧滅菌する。

付記 15 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。