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（シード）

平成 30 年９月 11 日（告示第 2046 号）　新規追加

1 定義

シードロット規格に適合した組換え豚サーコウイルス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。）遺伝子挿入バキュロウイルスを同規格に適合した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ァ核多角体ウイルス（AcNPV）N120-058W 株又はこれと同等と認められた株

2.1.2 性状

バキュロウイルスに感受性のある培養細胞で CPE を伴って増殖する。PCV2ORF2 たん白抗原を発現する。

2.1.3 マスターシードウイルス

2.1.3.1 作製、保存及び小分製品までの最高継代数

マスターシードウイルスは、Sf 細胞（付記１）で増殖させ、連続した工程により作製し、保存用の容器に分注する。

分注したマスターシードウイルスは、特定の製造番号又は製造記号を付し、凍結してー 70 ℃以下又は凍結乾燥して５℃以下で保存する。

マスターシードウイルスについて、3.1.1 の試験を行う。

マスターシードウイルスは、ワクチンの製造以外の目的で継代しない。マスターシードウイルスから小分製品までの最高継代数は、５代以内でなければならない。

2.1.4 ワーキングシードウイルス

2.1.4.1 増殖、継代及び保存

ワーキングシードウイルスは、Sf 細胞で増殖及び継代する。

ワーキングシードウイルスは、凍結してー 70 ℃以下又は凍結乾燥して５℃以下で保存する。

ワーキングシードウイルスについて、3.1.2 の試験を行う。

2.1.5 プロダクションシードウイルス

2.1.5.1 増殖及び保存

プロダクションシードウイルスは、Sf 細胞で増殖させる。

プロダクションシードウイルスを保存する場合は、凍結してー 70 ℃以下又は凍結乾燥して５℃以下で保存する。

プロダクションシードウイルスを保存する場合は、3.1.3 の試験を行う。

2.2 製造用材料

2.2.1 培養細胞

Sf 細胞を用いる。

2.2.2 培養液

製剤ごとに農林水産大臣が適当と認めた培養液を用いる。

2.2.3 マスターセルシード

2.2.3.1 作製、保存及びプロダクションセルシードまでの最高継代数

マスターセルシードは、2.2.2 の培養液で増殖させ、連続した工程により作製し、保存用の容器に分注する。

分注したマスターセルシードは、特定の製造番号又は製造記号を付し、凍結して－ 70 ℃以下で保存する。

マスターセルシードについて、3.2.1 の試験を行う。

マスターセルシードは、ワクチンの製造又は試験以外の目的で継代しない。マスターセルシードからプロダクションセルシードまでの最高継代数は、20 代以内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、その継代数とする。

2.2.4 ワーキングセルシード

2.2.4.1 増殖、継代及び保存

ワーキングセルシードは、2.2.2 の培養液で増殖及び継代する。

ワーキングセルシードは、凍結して－ 70 ℃以下で保存する。

ワーキングセルシードについて、3.2.2 の試験を行う。

2.2.5 プロダクションセルシード

2.2.5.1 増殖及び保存

プロダクションセルシードは、2.2.2 の培養液で増殖させる。

プロダクションセルシードを保存する場合は、凍結して－ 70 ℃以下で保存する。

プロダクションセルシードを保存する場合は、3.2.3 の試験を行う。

2.3 原液

2.3.1 プロダクションセルシードの培養

１回に処理し、培養した細胞を個体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

プロダクションシードウイルスを 2.3.1 の細胞で培養し、ウイルスの増殖極期に個体別培養細胞ごとに採取した培養液をウイルス培養液とする。

ウイルス培養液について、3.3 の試験を行う。

2.3.3 不活化

ウイルス培養液をろ過し、製剤ごとに農林水産大臣が適当と認めた不活化剤を加えて撹拌し不活化した後に、中和剤を加えて中和し、必要に応じて濃縮したものを原液とする。

原液について、3.4 の試験を行う。

2.3.4 原液の調整

原液を混合し、混合原液とする場合がある。

混合原液について、3.4.2 の試験を行う。

2.4 最終バルク

原液又は混合原液に、必要に応じて生理食塩液及び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、3.5 の試験を行う。

3 試験法

3.1 製造用株の試験

3.1.1 マスターシードウイルスの試験

3.1.1.1 同定試験

シードロット規格の 1.4.2.3.1.1 を準用して試験するとき、適合しなければならない。

3.1.1.2 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。

3.1.1.3 マイコプラズマ否定試験

一般試験法のマイコプラズマ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。

3.1.1.4 外来性ウイルス否定試験

3.1.1.4.1 共通ウイルス否定試験

一般試験法の外来性ウイルス否定試験法の 1.1、2.1 及び 2.2 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、その試験法とする。

3.1.1.4.2 特定ウイルス否定試験

3.1.1.4.2.1 特定ウイルス否定一般試験

豚繁殖・呼吸障害症候群ウイルスについて、一般試験法の外来性ウイルス否定試験法の 1.1 及び 3.1.1 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、農林水産大臣が特に認めた場合には、その試験法とする。

3.1.1.4.2.2 個別ウイルス否定試験

豚コレラウイルス、豚サーコウイルス、牛ウイルス性下痢－粘膜病ウイルス、ロタウイルス、日本脳炎ウイルス及び狂犬病ウイルスについて、一般試験法の外来性ウイルス否定試験法の 1.1、3.2.3、3.2.4、3.2.5、3.2.7 及び 3.2.9 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、その試験法とする。

3.1.1.5　組換え遺伝子等安定性確認試験

一般試験法の組換え遺伝子等安定性確認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。

3.1.2 ワーキングシードウイルスの試験

3.1.2.1 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。

3.1.2.2 マイコプラズマ否定試験

一般試験法のマイコプラズマ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。

3.1.3 プロダクションシードウイルスの試験

3.1.3.1 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。

3.1.3.2 マイコプラズマ否定試験

一般試験法のマイコプラズマ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。

3.2 株化細胞の試験

3.2.1 マスターセルシードの試験

3.2.1.1 培養性状試験

シードロット規格の 2.1.4.2.1.1 を準用して試験するとき、適合しなければならない。

3.2.1.2 起源動物種同定試験

シードロット規格の 2.1.4.2.1.2 を準用して試験するとき、適合しなければならない。

3.2.1.3 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。

3.2.1.4 マイコプラズマ否定試験

一般試験法のマイコプラズマ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。

3.2.1.5 外来性ウイルス否定試験

3.2.1.5.1 共通ウイルス否定試験

一般試験法の外来性ウイルス否定試験法の 1.2、2.1 及び 2.2 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、その試験法とする。

3.2.1.5.2 特定ウイルス否定試験

3.2.1.5.2.1 特定ウイルス否定一般試験

豚繁殖・呼吸障害症候群ウイルスについて、一般試験法の外来性ウイルス否定試験法の 1.2 及び 3.1.1 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、農林水産大臣が特に認めた場合には、その試験法とする。

3.2.1.5.2.2 個別ウイルス否定試験

豚コレラウイルス、豚サーコウイルス、牛ウイルス性下痢－粘膜病ウイルス、ロタウイルス、日本脳炎ウイルス及び狂犬病ウイルスについて、一般試験法の外来性ウイルス否定試験法の 1.2、3.2.3、3.2.4、3.2.5、3.2.7 及び 3.2.9 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、その試験法とする。

3.2.1.6 核学的（染色体）性状試験

シードロット規格の 2.1.4.2.1.6.1 を準用して試験するとき、適合しなければならない。

3.2.1.7 腫瘍形成性/腫瘍原性試験

シードロット規格の 2.1.4.2.1.7 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 ワーキングセルシードの試験

3.2.2.1 培養性状試験

シードロット規格の 2.1.4.2.2.1 を準用して試験するとき、適合しなければならない。

3.2.2.2 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。

3.2.2.3 マイコプラズマ否定試験

一般試験法のマイコプラズマ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。

3.2.3 プロダクションセルシードの試験

3.2.3.1 培養性状試験

シードロット規格の 2.1.4.2.3.1 を準用して試験するとき、適合しなければならない。

3.2.3.2 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。

3.2.3.3 マイコプラズマ否定試験

一般試験法のマイコプラズマ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 ウイルス培養液の試験

3.3.1 マイコプラズマ否定試験

一般試験法のマイコプラズマ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。

3.4 原液の試験

3.4.1 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。

3.4.2 不活化試験

3.4.2.1 試験材料

3.4.2.1.1 試料

検体を試料とする。

3.4.2.1.2 培養細胞

Sf 細胞を用いる。

3.4.2.2 試験方法

検体を 150 ～ 175cm^2 の培養細胞に接種し、25 ～ 29 ℃で 7 日間培養し、次代に継代する。２代目の細胞を 25 ～ 29 ℃で 7 日間培養する。

3.4.2.3 判定

培養細胞に CPE を認めない場合、活性ウイルス陰性と判定する。検体に活性ウイルスを認めてはならない。

3.4.3 抗原含有量試験

3.4.3.1 試験材料

検体、参照抗原１（付記２）、陰性対照（付記３）及び陽性対照抗原１（付記４）、抗 PCV2ORF2 豚 IgG（付記５）、抗 PCV2ORF2 モノクローナル抗体（付記６）及び酵素標識抗体（付記７）を用いる。

3.4.3.2 試験方法

3.4.3.2.2 試料の調製

検体、参照抗原１、陰性対照及び陽性対照抗原１を洗浄・希釈液（付記８）でそれぞれ 30 倍から３倍階段希釈した各段階の希釈液を試料とする。

3.4.3.2.1 反応

抗 PCV2ORF2 豚 IgG を固相したプレートを用いる。固相プレートにブロッキング液（付記９）を 250 μ L ずつ加え、35 ～ 39 ℃で約 60 分間反応させた後、洗浄・希釈液で洗浄する。各試料 100 μ L ずつをプレートの３穴に加え、35 ～ 39 ℃で約 60 分間反応させる。反応後、プレートを洗浄液で洗浄する。洗浄・希釈液で 300 倍に希釈した抗 PCV2ORF2 モノクローナル抗体を各穴に 100 μ L ずつ分注し、35 ～ 39 ℃で約 60 分間反応させる。反応後、各穴を洗浄・希釈液で洗浄する。１ vol ％兎血清加希釈用緩衝液（付記 10）で 5,000 ～ 20,000 倍に希釈した酵素標識抗体を各穴に 100 μ L ずつ分注し、35 ～ 39 ℃で約 45 分間反応させる。反応後、各穴を洗浄・希釈液で洗浄する。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。

3.4.3.2.4 吸光度測定

波長 450nm で吸光度を測定する。

3.4.3.3 判定

参照抗原１の力価を 1.0 として、検体の相対力価を統計学的計算方法（付記 12）により算出する。このとき、検体の相対力価は、1.0 以上でなければならない。また、陽性対照抗原１の 270 倍希釈液の平均吸光度は 0.838 以上であり、陰性対照の 30 倍希釈液の平均吸光度は 0.2 以下でなければならない。

3.5 小分製品の試験

3.5.1 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、透明からやや混濁した無色から帯黄色、粘性のない液体でなければならず、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。

3.5.2 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。

3.5.3 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。

3.5.4 力価試験

3.5.4.1 試験材料

試験品、参照抗原２（参照ワクチン）（付記 13)、陰性対照抗原、陽性対照抗原２（付記 14)、抗 PCV2ORF2 豚 IgG、抗 PCV2ORF2 モノクローナル抗体及び酵素標識抗体を用いる。

3.5.4.2 試験方法

3.5.4.2.1 試料等の調製

試験品、参照抗原２（参照ワクチン)、陰性対照及び陽性対照抗原２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。

3.5.4.2.2 反応

3.4.3.2.1 を準用して行う。

3.5.4.2.3 吸光度測定

波長 450nm で吸光度を測定する。

3.5.4.3 判定

参照抗原２（参照ワクチン）の力価を 1.0 として、試験品の相対力価を統計学的計算方法により算出するとき、試験品の相対力価は、1.0 ～ 3.75 でなければならない。また、陽性対照抗原２の 480 倍希釈液の平均吸光度は 0.988 ～ 2.500、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。

付記１　Sf 細胞

Spodoptera frugiperda 卵巣由来細胞

付記２　参照抗原１

ワクチンの製造方法で製造されたもので、PCV2ORF2 抗原として約８μ g/mL 含むもの。

更新する場合には、元の参照抗原１に対する相対力価を求めておき、原液の相対力価測定時には元の参照抗原１と同等の抗原量となるよう調製する。

付記３　陰性対照

Sf 細胞培養液にワクチンのアジュバントを 20vol %含むもの

付記４　陽性対照抗原１

ワクチンの製造方法で製造されたもので、参照抗原１に対する相対力価 4.45 の PCV2ORF2 抗原液 31mL に対して生理食塩液９ mL を加えたもの。

更新する場合には、元の陽性対照抗原１との相対力価が統計的に同等になるよう調製する。

付記５　抗 PCV2ORF2 豚 IgG

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。

吸着用緩衝液（付記 14）で希釈して用いる。

付記６　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　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
無水リン酸水素二ナトリウム	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 5.0 w/v %になるように加えたもの

付記 10　１ vol %兎血清加希釈用緩衝液

洗浄・希釈液に兎正常血清を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溶液 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　参照抗原２（参照ワクチン）

「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加）不活化ワクチン」であって、動物医薬品検査所が適当と認めたもの。

参照抗原１に対する相対力価 4.45 の PCV2ORF2 抗原液を 52%、アジュバントを 20%及び生理食塩液を 28%含む。

更新する場合は、相対力価が 1.0 であり、元の参照抗原２と同等の免疫原性を確認したものとする。

付記 14　陽性対照抗原２

参照抗原１に対する相対力価 4.45 の PCV2ORF2 抗原液を 80vol %及びアジュバントを 20vol %含むもの。

更新する場合は、元の陽性対照抗原２との相対力価が統計的に同等になるよう調製する。

付記 15　吸着用緩衝液

1,000mL 中

炭酸水素ナトリウム	2.93 g
無水炭酸ナトリウム	1.59 g
水	残　量

pH を 9.5 ～ 9.7 に調整する。