

猫白血病（アジュバント加）不活化ワクチン

平成18年8月16日付 農林水産省告示第1162号

1 定義

猫白血病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、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

猫白血病ウイルス・リカード株感染 NCE-F161 細胞株又はこれと同等と認められた株

2.1.2 性状

製造用株由来の猫白血病ウイルス・リカード株はレトロウイルス科オンコウイルス亜科の性状を示し、サブグループ A 及び B のウイルスを含んでいる。

2.1.3 継代及び保存

原株及び種細胞は、適当と認められた培地で継代する。継代は原株から 10 代以内とし、凍結して液体窒素中に保存する。

2.2 製造用材料

2.2.1 製造用感染細胞

液体窒素中に保存されている種細胞を融解して用いる。

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 製造用感染細胞の培養

種細胞を複数回継代したものを本培養とする。本培養において増殖したウイルスを含む培養液を複数回採材する。採材した培養液は遠心操作で細胞残渣を除去し、その上清をウイルス浮遊液とする。

2.3.2 不活化及び濃縮

ウイルス浮遊液にホルマリン又は適当と認められた不活化剤を加えてウイルスを不活化し、不活化ウイルス液とする。不活化ウイルス液を濃縮し、適当と認められた保護剤を加えたものを原液とする。

原液について、3.1の試験を行う。

2.4 最終バルク

希釈した原液に油性アジュバント又はこれと同等と認められたアジュバントを加え、混合したものを最終バルクとする。

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、3.2の試験を行う。

3 試験法

3.1 原液の試験

3.1.1 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 不活化試験

3.1.2.1 試験材料

3.1.2.1.1 試料

試験品の3mLを試料とする。

3.1.2.1.2 培養細胞

猫腎由来株化細胞を用いる。

3.1.2.2 試験方法

細胞・ウイルス増殖用培養液（付記1）30mLに対して0.2mLの0.25w/v%ポリブレン溶液（付記2）を加え、これを用いて培養細胞を37℃で1～2日間培養する。培養液を除き試料の全量を1mLにつき25cm²以上のポリブレン溶液で処理した培養細胞に接種する。37℃で1時間吸着させ、細胞・ウイルス増殖用培養液を加えて37℃で4～7日間培養する。培養液及び培養細胞を回収し、2回凍結融解後、遠心して上清を採取する。96ウェルマイクロプレートにポリブレン溶液で処理した培養細胞を準備し、遠心上清の原液及び10倍希釈液をそれぞれ10ウェルずつ接種する。37℃で4～6日間培養後、培養細胞をアセトン固定し、抗FeLV血清を一次抗体とした間接蛍光抗体法を行なう。

3.1.2.3 判定

遠心上清原液を接種した全ウェルに特異蛍光を認めない場合、活性ウイルス陰性と判定する。試料に活性ウイルスを認めてはならない。

3.1.3 抗原定量試験

以下の試験法又は適当と認められた試験法を用いる。

3.1.3.1 試験材料

試験品、参照品（付記3）、陽性対照（付記4）、陰性対照（付記5）及び抗体固相化プレート（付記6）を使用する。

ただし、試験品は-70℃以下に少なくとも一夜保存したものをを用いる。

3.1.3.2 試験方法

希釈液（付記7）で試験品を100倍、参照品及び陰性対照を50倍に希釈する。希釈した各試料を85℃で24時間加熱処理する。その後、試験品は希釈液を用いて原液、2倍、3倍、4倍及び5倍の希釈列を作成する。同様に参照品も希釈液を用いて原液、2倍、4倍、6倍及び8倍の希釈列を作成する。各希釈列の試料、陰性対照、陽性対照及び希釈液を抗体固相化プレートの所定のウェルに100μLずつ加え、25℃で90分間反応させる。洗浄液（付記8）で3回洗浄した後、抗gp70モノクローナル抗体を各ウェルに100μLずつ加え、25℃90分または37℃で60分間反応させる。洗浄液で3回洗浄した後、標識抗体（付記9）を各ウェルに100μLずつ加え、25℃90分または37℃で60分間反応させる。洗浄液で3回洗浄後、基質液（付記10）を各ウェルに100μLずつ加え、25℃で60分間反応させる。吸光度を650nmの波長で測定し、参照品原液を反応させたウェルの吸光度値（以下「OD値」という。）が1.000～1.200を示したときにすべてのウェルを測定する。各OD値から希釈液を加えたウェルの平均OD値を引いたものをそれぞれの測定OD値とする。

3.1.3.3 判定

参照品のgp70抗原量を1.0として、試験品中のgp70抗原の相対量（以下「抗原相対量」という。）を統計学的計算方法（付記11）により算出するとき、抗原相対量は1.5以上でなければならない。また、陰性対照の測定OD値の平均値は0.050以下、陽性対照の測定OD値の平均値は0.450～0.740でなければならない。

3.2 小分製品の試験

3.2.1 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、小分製品は淡桃色の白濁した液体でなければならない。異物又は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。

3.2.2 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、水素イオン濃度はpH 7.0~7.5でなければならない。

3.2.3 無菌試験

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。

3.2.4 不活化試験

以下の試験又は3.1.2を準用する。

3.2.4.1 試験材料

3.2.4.1.1 試料

試験品の2mLを100倍量以上のリン酸緩衝食塩液を用いて、4℃で一夜透析し、不活化剤を除去したものを試料とする。

3.2.4.1.2 培養細胞

CC81細胞（付記12）を用いる。

3.2.4.3 試験方法

単層を形成した培養細胞25cm²に対して増殖培養液で（付記13）で200倍に希釈したDEAE - デキストラン溶液（付記14）1 mLを加え、37℃で1時間処理する。試料の1mLを25cm²のDEAE - デキストラン溶液で処理した培養細胞に接種し、37℃で1時間吸着させる。試料を除き細胞表面を洗浄後、増殖用培養液を加えて37℃で12日間培養する。ただし、増殖用培養液は4日間隔で更新する。

3.2.4.4 判定

培養細胞にフォーカスの形成を認めない場合、活性ウイルス陰性と判定する。

試料に活性ウイルスを認めてはならない。

3.2.5 チメロサル定量試験

チメロサル添加製剤については、一般試験法のチメロサル定量法を準用して試験するとき、適合しなければならない。

3.2.6 ホルマリン定量試験

ホルマリン添加製剤については、一般試験法のホルマリン定量法を準用して試験するとき、ホルマリンの含有量は0.2vol%以下でなければならない。

3.2.7 毒性限度確認試験

一般試験法の毒性限度確認試験法1により試験を行い、これに適合しなければならない。

3.2.8 安全試験

3.2.8.1 試験材料

3.2.8.1.1 注射材料

試験品を注射材料とする。

3.2.8.1.2 試験動物

6か月齢未満の猫を用いる。

3.2.8.2 試験方法

試験動物3頭を試験群、2頭を対照群とする。試験群に注射材料1頭分を用法に従って注射し、対照群とともに5週間観察する。

3.2.8.3 判定

観察期間中、対照群においては臨床的な異常を認めてはならず、試験群においては注射部位の疼痛、不快感、腫脹、硬結を示すことがあってもいずれも軽度であり、その他の異常を認めてはならない。

3.2.9 抗原定量試験

3.1.3を準用して小分製品中の抗原相対量を測定するとき、抗原相対量は1.0以上でなければならない。

4 貯法及び有効期間

有効期間は1年5か月間とする。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。

5 その他（添付文書等記載事項）

5.1 猫において、不活化ワクチンの注射により、注射後3か月～2年の間に、まれに（1/1,000～1/10,000程度）線維肉腫等の肉腫が発生するとの報告がある。

5.2 猫において、不活化ワクチンを同一部位へ反復注射することにより、線維肉腫等の肉腫の発症率が高まるとの報告があるので、ワクチン注射歴のある部位への注射は避けること。

付記1 細胞・ウイルス増殖用培養液

1,000mL中

牛血清 100mL

L-グルタミン(200mM) 10mL

硫酸ゲンタマイシン 20mg

イ-グルMEM 適量

炭酸水素ナトリウムでpHを7.0に調整したもの

付記2 ポリブレン溶液

100mL中

ポリブレン 0.25g

精製水 残量

121℃で15分間滅菌したもの

付記3 参照品

動物医薬品検査所が適当と認めたもの

付記4 陽性対照

参照品を希釈液で100倍に希釈し、85℃で24分間加熱処理し-70℃以下に保存したもの

付記5 陰性対照

ワクチンウイルスを接種しない培養細胞について、ワクチンの製造方法と同様に不活化処理、濃縮及びアジュバントの添加を行った培養液で-70℃以下に保存したもの

付記6 抗体固相化プレート

コーティング緩衝液で適当な濃度に希釈した抗gp70山羊ポリクローナル抗体の100μLずつをマイクロプレートの各ウエルに加え、25℃で一夜反応したもの

付記7 希釈液

1,000mL中

塩化ナトリウム 8.0g

塩化カリウム 0.2g

無水リン酸水素二ナトリウム 1.15g

リン酸二水素カリウム 0.2g

トライトン X-100 5.0mL

精製水 残量

ただし、トライトン -100を添加する前のpHを7.2に調整したもの

付記8 洗浄液

1,000mL 中

塩化ナトリウム 8.0g

塩化カリウム 0.2g

無水リン酸水素二ナトリウム 1.15g

リン酸二水素カリウム 0.2g

ポリソルベート20 0.5mL

精製水 残量

ただし、ポリソルベート20を添加する前のpHを7.2に調整したもの

付記9 標識抗体

酵素標識した抗マウスIgG (H+L) 抗体で、洗浄液に5.0vol%となるように牛血清を添加した液で適当に調整したもの

付記10 基質液

酢酸ナトリウムの9.02w/v%液を飽和クエン酸でpH5.5とした液の10mLに、ジメチルスルホキシドの10mLに3、3'、5、5' テトラメチルベンチジン200mgを溶解した液の100 μ Lと3vol%過酸化水素水の10 μ Lを添加したもの

付記11 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12 CC81細胞

猫腎由来株化細胞であるCRFK細胞をマウス肉腫ウイルスで形質転換させた細胞

付記13 細胞増殖用培養液

1,000mL 中

トリプトース・ホスフェイト・ブロス 100mL

L-グルタミン(200mM) 10mL

牛血清 50 mL

ペニシリンGカリウム 20万単位

硫酸ストレプトマイシン 200mg力価

イーグルMEM 残量

炭酸水素ナトリウムでpH を7.2~7.6に調整したもの

付記14 DEAE - デキストラン溶液

1,000mL中

DEAE - デキストラン 10.0g

精製水 残量

121 で15分間滅菌したもの