

猫ウイルス性鼻気管炎・猫カリシウイルス感染症・猫汎白血球減少症混合生ワクチン

1 定義

弱毒猫ウイルス性鼻気管炎ウイルス、弱毒猫カリシウイルス及び弱毒猫汎白血球減少症ウイルスをそれぞれ培養細胞で増殖させて得たウイルス液を混合し、凍結乾燥したワクチンである。

2 製法

2.1 製造用株

2.1.1 猫ウイルス性鼻気管炎ウイルス株

2.1.1.1 名称

弱毒猫ウイルス性鼻気管炎ウイルス FVRm 株又はこれと同等と認められた株

2.1.1.2 性状

猫に注射しても病原性を示さない。猫腎継代細胞に接種すると CPE を伴って増殖する。

2.1.1.3 継代及び保存

原株及び原種ウイルスは、猫腎継代細胞又は適当と認められた培養細胞で継代する。

原株の継代は、原種ウイルスの製造又は原株の恒常的な維持以外の目的で行ってはならない。原種ウイルスは、直接原株から連続した工程により製造し、種ウイルスは、原株から 5 代以内に製造しなければならない。

原株及び原種ウイルスは、凍結して - 70 以下又は凍結乾燥して 5 以下で保存する。

種ウイルスは、原種ウイルスからワクチンの製造ごとに用時調製する。

2.1.2 猫カリシウイルス株

2.1.2.1 名称

弱毒猫カリシウイルス F9 株又はこれと同等と認められた株

2.1.2.2 性状

猫に注射しても病原性を示さない。猫腎継代細胞に接種すると CPE を伴って増殖する。

2.1.2.3 継代及び保存

原株及び原種ウイルスは、猫腎継代細胞又は適当と認められた培養細胞で継代する。

原株の継代は、原種ウイルスの製造又は原株の恒常的な維持以外の目的で行ってはならない。原種ウイルスは、直接原株から連続した工程により製造し、種ウイルスは、原株から 5 代以内に製造しなければならない。

原株及び原種ウイルスは、凍結して - 70 以下又は凍結乾燥して5 以下で保存する。

種ウイルスは、原種ウイルスからワクチンの製造ごとに用時調製する。

2.1.3 猫汎白血球減少症ウイルス株

2.1.3.1 名称

弱毒猫汎白血球減少症ウイルス Snow Leopard 株又はこれと同等と認められた株

2.1.3.2 性状

猫に注射しても病原性を示さない。猫腎継代細胞に接種すると増殖し、その培養液は、豚の赤血球を凝集する。

2.1.3.3 継代及び保存

原株及び原種ウイルスは、猫腎継代細胞又は適当と認められた培養細胞で継代する。

原株の継代は、原種ウイルスの製造又は原株の恒常的な維持以外の目的で行ってはならない。原種ウイルスは、直接原株から連続した工程により製造し、種ウイルスは、原株から5代以内に製造しなければならない。

原株及び原種ウイルスは、凍結して - 70 以下又は凍結乾燥して5 以下で保存する。

種ウイルスは、原種ウイルスからワクチンの製造ごとに用時調製する。

2.2 製造用材料

2.2.1 猫ウイルス性鼻気管炎ウイルス

2.2.1.1 培養細胞

猫腎継代細胞又は製造に適当と認められた培養細胞を用いる。

2.2.1.2 培養液

製造に適当と認められた培養液を用いる。

2.2.2 猫カリシウイルス

2.2.2.1 培養細胞

猫腎継代細胞又は製造に適当と認められた培養細胞を用いる。

2.2.2.2 培養液

製造に適当と認められた培養液を用いる。

2.2.3 猫汎白血球減少症ウイルス

2.2.3.1 培養細胞

猫腎継代細胞又は製造に適当と認められた培養細胞を用いる。

2.2.3.2 培養液

製造に相当と認められた培養液を用いる。

2.3 原液

2.3.1 猫ウイルス性鼻気管炎ウイルス原液

2.3.1.1 細胞の培養

1 回に処理し、培養した細胞を個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。

個別培養細胞について、3.1 の試験を行う。

2.3.1.2 ウイルスの培養

種ウイルスを培養細胞に接種し、29 ~ 31 で培養し、ウイルスの増殖極期に個別培養細胞ごとに採取した培養液、そのろ液、遠心上清又はこれらを濃縮したものを混合し、相当と認められた安定剤を加え、原液とする。ただし、特に承認されたものは、その培養方法とする。

原液について、3.2 及び 3.2.3.1 の試験を行う。

2.3.2 猫カリシウイルス原液

2.3.2.1 細胞の培養

1 回に処理し、培養した細胞を個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。

個別培養細胞について、3.1 の試験を行う。

2.3.2.2 ウイルスの培養

種ウイルスを培養細胞に接種し、35 ~ 37 で培養し、ウイルスの増殖極期に個別培養細胞ごとに採取した培養液、そのろ液、遠心上清又はこれらを濃縮したものを混合し、相当と認められた安定剤を加え、原液とする。ただし、特に承認されたものは、その培養方法とする。

原液について、3.2 及び 3.2.3.2 の試験を行う。

2.3.3 猫汎白血球減少症ウイルス原液

2.3.3.1 細胞の培養

1 回に処理し、培養した細胞を個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。

個別培養細胞について、3.1 の試験を行う。

2.3.3.2 ウイルスの培養

種ウイルスを培養細胞に接種し、35 ~ 37 で培養し、ウイルスの増殖極期に個別培養細胞ごとに採取した培養液、そのろ液、遠心上清又はこれらを濃縮したものを混合し、相当と認

められた安定剤を加え、原液とする。ただし、特に承認されたものは、その培養方法とする。
原液について、3.2 及び 3.2.3.3 の試験を行う。

2.4 最終バルク

猫ウイルス性鼻気管炎ウイルス原液、猫カリシウイルス原液及び猫汎白血球減少症ウイルス原液を混合し、適当と認められた培養液を加えてよく攪拌し、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、凍結乾燥し、小分製品とする。

小分製品について、3.3 の試験を行う。

3 試験法

3.1 培養細胞の試験

個体別培養細胞の 1 % 以上を対照培養細胞とし、これについて次の試験を行う。

ただし、製造に継代細胞を用いる場合には、3.1.3 の試験を実施しなくてもよい。

3.1.1 培養観察

対照培養細胞を、ウイルスを接種することなく、ウイルスの培養と同じ条件で培養する。対照培養細胞をプールし、4 本以上の培養びん及びカバーグラスを入れた 4 枚以上のシャーレに継代し、7 日間以上培養し、観察するとき、CPE を認めてはならない。

3.1.2 赤血球吸着試験

3.1.1 の試験最終日に培養びんの培養液を除き、リン酸緩衝食塩液で細胞表面を 2 回洗浄し、0.1vol % のモルモット赤血球浮遊液を重層し、60 分間静置し、観察するとき、培養細胞に赤血球吸着を認めてはならない。

3.1.3 封入体染色試験

3.1.1 の試験最終日に培養カバーグラスをリン酸緩衝食塩液で洗浄し、固定した後、ギムザ染色し、封入体の有無を観察するとき、培養細胞に封入体を認めてはならない。

3.2 原液の試験

3.2.1 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。

3.2.2 ウイルス含有量試験

3.2.2.1 猫ウイルス性鼻気管炎ウイルス含有量試験

3.2.2.1.1 試験材料

3.2.2.1.1.1 試料

検体をウイルス増殖用培養液（付記 1）又は適当と認められた希釈液で 10 倍階段希釈し、各段階の希釈液を試料とする。

3.2.2.1.1.2 培養細胞

猫腎継代細胞を用いる。

3.2.2.1.2 試験方法

試料 0.1mL ずつをそれぞれ 4 本（穴）以上の培養細胞に接種した後、37℃ で 7 日間培養する。ただし、特に承認されたものは、その試験方法とする。

3.2.2.1.3 判定

特徴的な CPE を認めたものを感染とみなし、TCID₅₀ を算出する。

検体のウイルス含有量は、それぞれ最終バルクを調整するのに十分な含有量を示さなければならぬ。

ただし、特に承認されたものは、その判定方法とする。

3.2.2.2 猫カリシウイルス含有量試験

3.2.2.2.1 試験材料

3.2.2.2.1.1 試料

検体をウイルス増殖用培養液又は適当と認められた希釈液で 10 倍階段希釈し、各段階の希釈液を試料とする。

3.2.2.2.1.2 培養細胞

猫腎継代細胞を用いる。

3.2.2.2.2 試験方法

試料の 0.1mL ずつを、それぞれ 4 本（穴）以上の培養細胞に接種した後、37℃ で 7 日間培養する。ただし、特に承認されたものは、その試験方法とする。

3.2.2.2.3 判定

特徴的な CPE を認めたものを感染とみなし TCID₅₀ を算出する。

検体のウイルス含有量は、それぞれ最終バルクを調整するのに十分な含有量を示さなければならぬ。

ただし、特に承認されたものは、その判定方法及びウイルス含有量とする。

3.2.2.3 猫汎白血球減少症ウイルス含有量試験

3.2.2.3.1 試験材料

3.2.2.3.1.1 試料

検体をウイルス増殖用培養液又は適当と認められた希釈液で 10 倍階段希釈し、各段階の希釈液を試料とする。

3.2.2.3.1.2 培養細胞

猫腎継代細胞を用いる。

3.2.2.3.2 試験方法

試料 0.1mL ずつをそれぞれ 4 本（穴）以上の培養細胞に接種し、37℃ で 24 時間静置培養した後、ウイルス増殖用培養液と交換し、更に 37℃ で 6 日間培養する。培養後、培養液を採取し、これに等量の牛血清アルブミン加ホウ酸緩衝食塩液（付記 2）を加え、更にこの混合液と VAD6.0 液（付記 3）により調整した 0.3 ~ 0.5vol % 豚赤血球浮遊液を等量加え、2 ~ 5℃ で静置後、観察する。ただし、特に承認されたものは、その試験方法とする。

3.2.2.3.3 判定

培養液に赤血球凝集を認めたものを感染とみなし、TCID₅₀ を算出する。

検体のウイルス含有量は、それぞれ最終バルクを調整するのに十分な含有量を示さなければならない。

ただし、特に承認されたものは、その判定方法とする。

3.3 小分製品の試験

3.3.1 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、固有の色調を有する乾燥物でなければならない。溶解したものは、固有の色調を有する均質な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。

3.3.2 真空度試験

一般試験法の真空度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。

3.3.3 含湿度試験

一般試験法の含湿度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。

3.3.4 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。

3.3.5 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。

ただし、原液を含む中間工程でマイコプラズマ否定試験を実施する場合には、本試験の実施を省略することができる。

3.3.6 迷入ウイルス否定試験

一般試験法の迷入ウイルス否定試験法 1.1、2.6.1 及び 2.8.2 を準用して試験するとき、適合しななければならない。

ただし、中和用血清は、抗猫ウイルス性鼻気管炎ウイルス血清（付記 4）、抗猫カリシウイルス血清（付記 5）及び抗猫汎白血球減少症ウイルス血清（付記 6）をそれぞれ非働化したものを用いる。

3.3.7 ウイルス含有量試験

3.3.7.1 猫ウイルス性鼻気管炎ウイルス含有量試験

3.3.7.1.1 試験材料

3.3.7.1.1.1 試料

試験品中の猫ウイルス性鼻気管炎ウイルス以外のウイルスを各抗血清（付記 5 及び 6）を非働化したもので中和したものをウイルス増殖用培養液で 10 倍階段希釈し、各段階の希釈液を試料とする。

3.3.7.1.1.2 培養細胞

猫腎継代細胞を用いる。

3.3.7.1.2 試験方法

試料 0.1mL ずつをそれぞれ 4 本（穴）以上の培養細胞に接種し、37℃ で 60 分間吸着させた後、ウイルス増殖用培養液を加え、37℃ で 7 日間培養し、観察する。ただし、特に承認されたものは、その試験方法とする。

3.3.7.1.3 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 頭当たり $10^{3.6}$ TCID₅₀ 以上でなければならない。

ただし、特に承認されたものは、その判定方法とする。

3.3.7.2 猫カリシウイルス含有量試験

3.3.7.2.1 試験材料

3.3.7.2.1.1 試料

試験品中の猫カリシウイルス以外のウイルスを各抗血清（付記 4 及び 6）を非働化したもので中和したものをウイルス増殖用培養液で 10 倍階段希釈し、各段階の希釈液を試料とする。

3.3.7.2.1.2 培養細胞

猫腎継代細胞を用いる。

3.3.7.2.2 試験方法

試料 0.1 mL ずつをそれぞれ 4 本（穴）以上の培養細胞に接種し、37℃ で 60 分間吸着させた後、ウイルス増殖用培養液を加え、37℃ で 5 日間培養し、観察する。ただし、特に承認されたものは、その試験方法とする。

3.3.7.2.3 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^{5.5}TCID₅₀ 以上でなければならない。

ただし、特に承認されたものは、その判定方法とする。

3.3.7.3 猫汎白血球減少症ウイルス含有量試験

3.3.7.3.1 試験材料

3.3.7.3.1.1 試料

試験品中の猫汎白血球減少症ウイルス以外のウイルスを各抗血清（付記 4 及び 5）を非働化したもので中和したものをウイルス増殖用培養液で 10 倍階段希釈し、各段階の希釈液を試料とする。

3.3.7.3.1.2 培養細胞

猫腎継代細胞を用いる。

3.3.7.3.2 試験方法

試料 0.1mL ずつをそれぞれ培養細胞浮遊液を分注した 4 本（穴）以上に接種し、37℃ で 24 時間培養した後、ウイルス増殖用培養液と交換し、更に 37℃ で 6 日間培養する。培養後、培養液を採取し、これに等量の牛血清アルブミン加ホウ酸緩衝食塩液を加え、更にこの混合液と VAD6.0 液により調整した 0.3 ~ 0.5vol % 豚赤血球浮遊液を等量加え、2 ~ 5℃ で静置した後、観察する

。ただし、特に承認されたものは、その試験方法とする。

3.3.7.3.3 判定

培養液に赤血球凝集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^{2.6}TCID₅₀ 以上でなければならない。

ただし、特に承認されたものは、その判定方法とする。

3.3.8 異常毒性否定試験

一般試験法の異常毒性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。

3.3.9 安全試験

3.3.9.1 試験材料

3.3.9.1.1 注射材料

試験品を注射材料とする。

3.3.9.1.2 試験動物

6 か月齢未満の猫を用いる。

3.3.9.2 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 頭分ずつ皮下にそれぞれ注射し、3 週間後に追加注射する。試験群及び対照群ともに 7 週間観察する。

3.3.9.3 判定

観察期間中、試験群及び対照群に異常を認めてはならない。

3.3.10 力価試験

3.3.10.1 猫ウイルス性鼻気管炎力価試験

3.3.10.1.1 試験材料

3.3.10.1.1.1 試験動物

3.3.9 の試験に用いた動物を用いる。

3.3.10.1.1.2 中和試験用ウイルス

適当と認められた猫ウイルス性鼻気管炎ウイルス株を用いる。

3.3.10.1.1.3 培養細胞

猫腎継代細胞を用いる。

3.3.10.1.2 試験方法

3.3.9 の試験最終日に試験群及び対照群から得られた血清について中和試験を行う。

各血清を非働化し、ウイルス増殖用培養液で 2 倍階段希釈する。各希釈血清と 0.2mL 中約 100PFU を含む中和試験用ウイルス液とを等量混合し、37 で 60 分間処理する。別に中和試験用ウイルスとウイルス増殖用培養液とを等量混合し、希釈血清と同様に処理したものを、ウイルス対照とする。各混合液 0.2mL ずつをそれぞれ 2 枚（穴）以上の猫腎継代細胞に接種し、37 で 60 分間吸着する。吸着後、混合液を除き第 1 次重層寒天培地（付記 7）を重層し、31 5 vol % 炭酸ガス下で 4 日間培養する。培養後、更に第 2 次重層寒天培地（付記 8）を重層し、31 5 vol % 炭酸ガス下で 24 時間培養する。ただし、特に承認されたものは、その試験方法とする。

3.3.10.1.3 判定

ブラック数がウイルス対照の 50 %以下に減少した血清の最高希釈倍数で中和抗体価を表す。

試験群の中和抗体価の幾何平均値は、4 倍以上でなければならない。この場合、対照群では 2 倍未満でなければならない。

ただし、特に承認されたものは、その判定方法とする。

3.3.10.2 猫カリシウイルス感染症力価試験

3.3.10.2.1 試験材料

3.3.10.2.1.1 試験動物

3.3.9 の試験に用いた動物を用いる。

3.3.10.2.1.2 中和試験用ウイルス

適当と認められた猫カリシウイルス株を用いる。

3.3.10.2.1.3 培養細胞

猫腎継代細胞を用いる。

3.3.10.2.2 試験方法

3.3.9 の試験最終日に試験群及び対照群から得られた血清について中和試験を行う。

各血清を非働化し、ウイルス増殖用培養液又は適当と認められた希釈液で 4 倍階段希釈する。各希釈血清と 0.1mL 中約 200TCID₅₀ を含む中和試験用ウイルス液とを混合し、35 ~ 37 °C で 90 分間処理する。各混合液を 0.1mL ずつをそれぞれ 4 本（穴）以上の猫腎継代細胞に接種し、35 ~ 37 °C で 7 日間培養し、CPE の有無を観察する。ただし、特に承認されたものは、その試験方法とする。

3.3.10.2.3 判定

培養細胞の CPE を阻止したものを陽性とし、中和抗体価を ED₅₀ で求める。

試験群の中和抗体価の幾何平均値は、15 倍以上でなければならない。この場合、対照群では 4 倍未満でなければならない。

ただし、特に承認されたものは、その判定方法及び抗体価とする。

3.3.10.3 猫汎白血球減少症力価試験

3.3.10.3.1 試験材料

3.3.10.3.1.1 試験動物

3.3.9 の試験に用いた動物を用いる。

3.3.10.3.1.2 赤血球凝集抗原

猫汎白血球減少症ウイルス赤血球凝集抗原（付記 9）を用いる。

3.3.10.3.2 試験方法

3.3.9 の試験最終日に試験群及び対照群から得られた血清について赤血球凝集抑制試験を行う。各血清を非働化し、25w/v %カオリン液及び豚赤血球を加えて処理した後、牛血清アルブミン加ホウ酸緩衝食塩液で2倍階段希釈する。各希釈血清に8単位の赤血球凝集抗原を混合し、常温で60分間処理し、この混合液と等量のVAD6.0液で調整した0.3 ~ 0.5vol %豚赤血球浮遊液を加え2 ~ 5 で一夜処理し、赤血球凝集の有無を観察する。ただし、特に承認されたものは、その試験方法とする。

3.3.10.3.3 判定

赤血球の凝集が抑制された血清の最高希釈倍数を赤血球凝集抑制抗体価とする。

試験群の赤血球凝集抑制抗体価の幾何平均値は、64倍以上でなければならない。この場合、対照群では、8倍未満でなければならない。

ただし、特に承認されたものは、その判定方法とする。

4 貯法及び有効期間

有効期間は、2年間とする。ただし、特に承認されたものは、その期間とする。

付記1 ウイルス増殖用培養液

1,000 mL 中

トリプトース・ホスフェイト・ブロス 2.95 g

牛胎子血清 0 ~ 20 mL

イーグル MEM 残 量

炭酸水素ナトリウムで pH を 7.4 ~ 7.6 に調整する。

必要最少量の抗生物質を加えてもよい。

付記2 牛血清アルブミン加ホウ酸緩衝食塩液

1,000 mL 中

塩化ナトリウム 7.01 g

ホウ酸 3.09 g

水酸化ナトリウム 0.96 g

水 残 量

牛血清アルブミンを 0.2w/v % となるように加えたのち、水酸化ナトリウム液で pH を 9.0

に調整する。

付記3 VAD6.0 液

1000mL 中

塩化ナトリウム 8.77g

無水リン酸水素二ナトリウム 5.68g

リン酸二水素ナトリウム二水和物 40.56g

水 残 量

牛血清アルブミン加ホウ酸緩衝食塩液と等量混合して pH を 6.0 に調整する。

付記4 抗猫ウイルス性鼻気管炎ウイルス血清

猫ウイルス性鼻気管炎ウイルスで免疫した兔又はモルモットの血清で、試験品のウイルスを完全に中和する力価を有するもの

付記5 抗猫カリシウイルス血清

猫カリシウイルスで免疫した兔又はモルモットの血清で、試験品のウイルスを完全に中和する力価を有するもの

付記6 抗猫汎白血球減少症ウイルス血清

猫汎白血球減少症ウイルスで免疫した兔又はモルモットの血清で、試験品のウイルスを完全に中和する力価を有するもの

付記7 第1次重層寒天培地

1,000 mL 中

寒天 10 g

トリプトース・ホスフェイト・ブロス 2.95 g

牛胎子血清 20 mL

イーグル MEM 残 量

炭酸水素ナトリウムで pH を 7.4 ~ 7.6 に調整する。

必要最少量の抗生物質を加えてもよい。

付記8 第2次重層寒天培地

1,000 mL 中

寒天 10 g

ニュートラルレッド 0.08 g

トリプトース・ホスフェイト・ブロス 2.95 g

イーグル MEM 残 量

炭酸水素ナトリウムで pH を 7.4 ~ 7.6 に調整する。

必要最少量の抗生物質を加えてもよい。

付記9 猫汎白血球減少症ウイルス赤血球凝集抗原

猫汎白血球減少症ウイルスを猫腎継代細胞で増殖させて得た培養上清又はこれを不活化したもので、赤血球凝集価 128 倍以上のもの