

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ワクチン

省 略

平成 14 年 10 月 3 日（告示第 1567 号） 一部改正

平成 16 年 12 月 13 日（告示第 2152 号） 一部改正

1 定義

弱毒猫ウイルス性鼻気管炎ウイルス及び弱毒猫カリシ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（以下「混合生ワクチン」という。）と猫汎白血球減少症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たワクチン（以下「液状不活化ワクチン」という。）とを組み合わせたものである。

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 F-2 株又はこれらと同等と認められた株

2.1.1.2 性状

猫に注射しても発熱その他の異常を示さない。猫舌培養細胞及び猫腎培養細胞に接種すると CPE を伴って増殖し、その培養液は、猫の赤血球を凝集する。

2.1.1.3 継代及び保存

原株及び原種ウイルスは、猫舌培養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久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 - 30 以下又は凍結乾燥して 7 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 F-9 株又はこれと同等と認められた株

2.1.2.2 性状

猫舌培養細胞及び猫腎培養細胞に接種すると CPE を伴って増殖する。また、猫に注射しても、発熱その他の異常を示さない。

2.1.2.3 継代及び保存

原株及び原種ウイルスは、猫舌培養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久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 - 30 以下又は凍結乾燥して 7 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

猫汎白血球減少症ウイルス P.M.株又はこれと同等と認められた株

2.1.3.2 性状

猫腎継代細胞に接種すると核内封入体を伴って増殖し、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

原株及び種ウイルスは、猫腎継代細胞で継代する。

継代は、原株から5代以内でなければならない。

原株及び種ウイルスは、凍結して - 30 以下又は凍結乾燥して 7 以下で保存する。

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

猫舌培養細胞又は製造に相当と認められた培養細胞を用いる。

2.2.1.2 培養液

製造に相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

猫舌培養細胞又は製造に相当と認められた培養細胞を用いる。

2.2.2.2 培養液

製造に相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相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、33 ~ 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て原液とする。

原液について、3.4.1.1 及び 3.4.1.2.1 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、33 ~ 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て原液とする。

原液について、3.4.1.1 及び 3.4.1.2.2 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、36 ~ 38 で培養し、ウイルスの増殖極期に個別細胞ごとに採取した培養液の遠心上清をウイルス浮遊液とする。

ウイルス浮遊液について、3.2 の試験を行う。

2.3.3.3 不活化

ウイルス浮遊液にホルマリンを加え、ウイルスを不活化する。不活化後、不活化剤を中和することができる。これを不活化ウイルス液とする。

不活化ウイルス液について、3.3 の試験を行う。

2.3.3.4 原液の調製

不活化ウイルス液を混合し、原液とする。

原液について、3.4.2 の試験を行う。

2.4 最終バルク

2.4.1 混合生ワクチン

猫ウイルス性鼻気管炎ウイルス原液及び猫カリシウイルス原液を混合し、適当と認められた安定剤を加え、最終バルクとする。

2.4.2 液状不活化ワクチン

猫汎白血球減少症ウイルス原液に適当と認められた保存剤を添加し、最終バルクとする。

2.5 小分製品

2.5.1 混合生ワクチン

最終バルクを小分容器に分注して、凍結乾燥し、小分製品とする。

小分製品について、3.5 の試験を行う。

2.5.2 液状不活化ワクチン

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 培養細胞の試験

個別培養細胞の 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ている場合は、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 % のモルト赤血球浮遊液を重層し、60 分間静置後、赤血球吸着の有無を観察するとき、培養細胞に赤血球の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 猫汎白血球減少症ウイルス浮遊液の試験

3.2.1 ウイルス含有量試験

3.2.1.1 又は 3.2.1.2 の試験を行う。

3.2.1.1 赤血球凝集反応による試験

3.2.1.1.1 試験材料

3.2.1.1.1.1 試料

検体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。

3.2.1.1.1.2 培養細胞

猫腎継代細胞を用いる。

3.2.1.1.2 試験方法

試料の 0.1mL ずつを、4 本（穴）以上の培養細胞浮遊液に加え、37℃ で 1～3 日間培養後、ウイルス増殖用培養液で液交換し、更に 6～10 日間培養する。培養最終日に、各希釈試料の培養液について、これに牛血清アルブミン加ホウ酸緩衝食塩液（付記 2）を等量加える。さらに、この混合液と等量の VAD6.0 液（付記 3）で調整した 0.3～0.5vol % 豚赤血球浮遊液を用いて赤血球凝集試験を行う。

3.2.1.1.3 判定

赤血球の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、1 mL 中 10^{3.2}TCID₅₀ 以上でなければならない。

3.2.1.2 蛍光抗体法による試験

3.2.1.2.1 試験材料

3.2.1.2.1.1 試料

検体を F-15 培地で 10 倍階段希釈し、各段階の希釈液を試料とする。

3.2.1.2.2 培養細胞

猫腎継代細胞を用いる。

3.2.1.2.2 試験方法

試料の 0.1mL ずつを、それぞれ 10 ウェル以上の培養細胞浮遊液に加え、35～37℃ で 6～7 日培養する。培養最終日に 85% 冷アセトンで細胞を -10～-30℃ で固定し、蛍光標識抗猫汎白血球減少症ウイルス抗体（付記 4）を加え、35～37℃ で 30～45 分間反応させた後、リン酸緩衝食塩液で洗浄し蛍光顕微鏡で観察する。

3.2.1.2.3 判定

特異蛍光が認められたものを感染とみなし、FAID₅₀ を算出する。

検体のウイルス含有量は、1 mL 中 10^{4.27}FAID₅₀/mL 以上でなければならない。

3.3 不活化ウイルス液の試験

3.3.1 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。

3.3.2 不活化試験

小分製品の液状不活化ワクチンについて本試験と同様の不活化試験を実施するものは、本試験を実施しなくてもよい。

3.3.2.1 試験材料

3.3.2.1.1 試料

検体 5 mL を 100 倍量以上のリン酸緩衝食塩液を用い、2～5℃ で一夜透析し、不活化剤を除去したものを試料とする。

3.3.2.1.2 培養細胞

猫腎継代細胞を用いる。

3.3.2.2 試験方法

試料の全量及び細胞増殖用培養液（付記 5）に浮遊させた猫腎継代細胞を同時に培養面積 25 cm²以上の培養びんで 37℃ で培養する。細胞が完全に単層を形成した後、ウイルス増殖用培養液で液交換し、更に 10 日間観察する。観察最終日に培養びんの培養液を採取し、これに牛血清アルブミン加ホウ酸緩衝食塩液を等量加える。更に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て、赤血球凝集の有無を観察する。

3.3.2.3 判定

培養細胞に CPE、培養液に赤血球凝集を認めない場合、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 原液の試験

3.4.1 混合生ワクチン

3.4.1.1 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。

3.4.1.2 ウイルス含有量試験

3.4.1.2.1 猫ウイルス性鼻気管炎ウイルス含有量試験

3.4.1.2.1.1 試験材料

3.4.1.2.1.1.1 試料

検体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。

3.4.1.2.1.1.2 培養細胞

猫腎継代細胞を用いる。

3.4.1.2.1.2 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。

3.4.1.2.1.3 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 1 mL 中 10^{6.0}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、そのウイルス含有量とする。

3.4.1.2.2 猫カリシウイルス含有量試験

3.4.1.2.2.1 試験材料

3.4.1.2.2.1.1 試料

検体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。

3.4.1.2.2.1.2 培養細胞

猫腎継代細胞を用いる。

3.4.1.2.2.2 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。

3.4.1.2.2.3 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 1 mL 中 10^{6.0}TCID₅₀ 以上でなければならない。

3.4.2 不活化ワクチンウイルス原液

3.4.2.1 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。ただし、最終バルクについて本試験と同様の無菌試験を実施するものは、本試験を実施しなくてもよい。

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、混合生ワクチンは、固有の色調を示す乾燥物でなければならない。液状不活化ワクチンは、固有の色調を有する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。混合生ワクチンを液状不活化ワクチンで溶解したものは、固有の色調を有する均質な固有の透明度を持つ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。

3.5.2 pH 測定試験

一般試験法の pH 測定試験を準用して試験するとき、液状不活化ワクチンの pH は、固有の値を示さなければならない。

3.5.3 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、混合生ワクチンは、適合しなければならない。

3.5.4 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。

3.5.5 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、混合生ワクチンは、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。

3.5.6 迷入ウイルス否定試験

液状不活化ワクチンと同量のリン酸緩衝食塩液で混合生ワクチンを溶解したものについて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 6）及び抗猫カリシウイルス血清（付記 7）をそれぞれ非働化したものを用いる。

なお、2 代継代時に 2 枚以上のカバーガラスについて間接蛍光抗体法で猫白血病ウイルスの検査をするとき、特異蛍光を認めてはならない。

3.5.7 ウイルス含有量試験

3.5.7.1 猫ウイルス性鼻気管炎ウイルス含有量試験

3.4.1.2.1 を準用して試験するとき、試験品のウイルス含有量は、1 頭分当たり $10^{5.0}$ TCID₅₀ 以上でなければならない。

ただし、試験品中の猫カリシウイルスを抗猫カリシウイルス血清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。

3.5.7.2 猫カリシウイルス含有量試験

3.4.1.2.2 を準用して試験するとき、試験品のウイルス含有量は、1 頭分当たり $10^{5.0}$ TCID₅₀ 以上でなければならない。

ただし、試験品中の猫ウイルス性鼻気管炎ウイルスを抗猫ウイルス性鼻気管炎ウイルス血清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。また、特に承認されたものは、そのウイルス含有量とする。

3.5.8 チメロサル定量試験

チメロサルを添加した液状不活化ワクチンについて、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。

3.5.9 ホルマリン定量試験

液状不活化ワクチンについて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、0.25vol % 以下でなければならない。

3.5.10 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。

3.5.11 安全試験

3.5.11.1 試験材料

3.5.11.1.1 注射材料

試験品を注射材料とする。

3.5.11.1.2 試験動物

6 か月齢未満の猫を用いる。

3.5.11.2 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それぞれ注射し、対照群とともに 5 週間観察する。

3.5.11.3 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。

3.5.12 力価試験

3.5.12.1 猫ウイルス性鼻気管炎力価試験

3.5.12.1.1 試験材料

3.5.12.1.1.1 試験動物

3.5.11 の試験に用いた動物を用いる。

3.5.12.1.1.2 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。

3.5.12.1.1.3 培養細胞

猫腎継代細胞を用いる。

3.5.12.1.2 試験方法

3.5.11 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 50 μ L 中約 60PFU 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 50 μ L ずつをそれぞれ 2 枚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 8）を重層し、37 5 vol % 炭酸ガス下で 2 日間培養する。培養後、さらに第 2 次重層寒天培地（付記 9）を重層し、37 で 24 時間培養する。

3.5.12.1.3 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は、8 倍以上でなければならない。この場合、対照群では、全て 2 倍以下でなければならない。

3.5.12.2 猫カリシウイルス感染症力価試験

3.5.12.2.1 試験材料

3.5.12.2.1.1 試験動物

3.5.11 の試験に用いた動物を用いる。

3.5.12.2.1.2 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。

3.5.12.2.1.3 培養細胞

猫腎継代細胞を用いる。

3.5.12.2.2 試験方法

3.5.11 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 2 倍階段希釈する。各希釈血清と 100 μ L 中約 200TCID₅₀ を含む中和試験用ウイルス液とを混合し、37 で 60 分間処理する。各混合液を 100 μ L ずつそれぞれ 4 本（穴）以上の猫腎継代細胞浮遊液に接種し、37 で 7 日間培養し、CPE の有無を観察する。

3.5.12.2.3 判定

2 本（穴）以上の試験管で CPE が抑制された血清の最高希釈倍数を中和抗体価とする。

試験群の中和抗体価は、16 倍以上でなければならない。この場合、対照群では、すべて 2 倍未満でなければならない。

3.5.12.3 猫汎白血球減少症力価試験

3.5.12.3.1 試験材料

3.5.12.3.1.1 注射材料

試験品を注射材料とする。

3.5.12.3.1.2 試験動物

体重約 100g のラットを用いる。

3.5.12.3.1.3 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 10）を用いる。

3.5.12.3.2 試験方法

試験動物 5 匹を試験群、2 匹を対照群とする。注射材料の 1 頭分ずつを試験群の筋肉内に注射し、3 週後に両群から得られた各個体の血清について赤血球凝集抑制試験を行う。

被検血清を 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 単位の猫汎白血球減少症ウイルス赤血球凝集抗原を混合し、常温で 60 分間処理し、VAD6.0 液で調整した 0.3 ~ 0.5vol % 豚赤血球浮遊液を加え、2 ~ 5 で一夜静置し、赤血球凝集の有無を観察する。

3.5.12.3.3 判定

赤血球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は、幾何平均値で 20 倍以上でなければならない。この場合、対照群では、すべて 8 倍未満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

1,000mL 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

1,000mL 中

塩化ナトリウム 10.52 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

1,000mL 中

塩化ナトリウム 8.77 g

無水リン酸水素二ナトリウム 5.68 g

リン酸二水素ナトリウム二水和物 40.56 g

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 蛍光標識抗猫汎白血球減少症ウイルス抗体
猫汎白血球減少症ウイルスに対するモノクローナル抗体を調整し、蛍光色素で標識したもの
- 付記 5 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 2.95 g
牛胎子血清 50 ~ 100 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 6 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兎の血清で、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 抗猫カリシウイルス血清
猫カリシウイルスで免疫した兎の血清で、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 8 第 1 次重層寒天培地
1,000mL 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 9 第 2 次重層寒天培地
1,000mL 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 10 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