

# 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（油性アジュバント加）不活化ワクチン

平成18年 3月22日（告示第 349号） 一部改正

## 1 定 義

猫ウイルス性鼻気管炎ウイルス、猫カリシウイルス及び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それぞれ不活化したものを混合し、油性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 猫ウイルス性鼻気管炎ウイルス株

##### 2.1.1.1 名称

猫ウイルス性鼻気管炎ウイルスFR-1株又はこれと同等と認められた株

##### 2.1.1.2 性状

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。

継代は原株では3代以内、種ウイルスでは2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 - 70 以下又は凍結乾燥して 5 以下で保存する。

#### 2.1.2 猫カリシウイルス株

##### 2.1.2.1 名称

猫カリシウイルスFC-7株又はこれと同等と認められた株

##### 2.1.2.2 性状

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。

継代は原株では3代以内、種ウイルスでは2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 - 70 以下又は凍結乾燥して 5 以下で保存する。

#### 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FP-5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、猫腎継代細胞又は適当と認められた培養細胞で継代する。

継代は原株では3代以内、種ウイルスでは2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 - 70 以下又は凍結乾燥して 5 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

###### 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、培養後、ウイルスの増殖極期に感染細胞相又は培養液を採取する。

感染細胞相を採取した場合は、その遠心沈渣を個別ウイルス感染細胞とする。

個別ウイルス感染細胞を採取した上清について、3.2.1及び3.2.2.1の試験を行う。

培養液を採取した場合は、培養液のろ液、遠心上清又はこれを濃縮したものをウイルス浮遊液とする。

ウイルス浮遊液について、3.2.1及び3.2.2.1の試験を行う。

###### 2.3.1.3 不活化

ウイルス感染細胞を可溶化処理し、遠心した上清又はウイルス浮遊液にホルマリンを加えてウイルスを不活化し、不活化ウイルス液とする。不活化後、不活化剤を中和することができる。また、不活化ウイルス液を濃縮してもよい。不活化ウイルス液又は不活化ウイルス濃縮液を原液とする。

原液について、3.3の試験を行う。

##### 2.3.2 猫カリシウイルス

###### 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、培養後、ウイルスの増殖極期に採取した培養液又はその遠心上清を個別ウイルス浮遊液とする。

ウイルス浮遊液について、3.2.1及び3.2.2.2の試験を行う。

###### 2.3.2.3 不活化

ウイルス浮遊液にホルマリンを加えてウイルスを不活化し、不活化ウイルス液とする。その後、不活化剤を中和してもよい。不活化ウイルス液を濃縮し、原液とする。

原液について、3.3の試験を行う。

##### 2.3.3 猫汎白血球減少症ウイルス

###### 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。

個体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、培養後、ウイルスの増殖極期に採取した培養液、又はそ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、3.2.1及び3.2.2.3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てウイルスを不活化し、不活化ウイルス液とする。その後、不活化剤を中和してもよい。不活化ウイルス液を濃縮し、原液とする。

原液について、3.3の試験を行う。

#### 2.3.4 原液の混合

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、三種混合原液とする。

三種混合原液について、3.4の試験を行う。

#### 2.4 最終バルク

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、3.5の試験を行う。

### 3 試験法

#### 3.1 培養細胞の試験

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、0.1 vol%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、封入体の有無を確認するとき、培養細胞に封入体を認めてはならない。

#### 3.2 ウイルス感染細胞上清又はウイルス浮遊液の試験

##### 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）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

試料の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日間回転又は静置培養し、観察する。

#### 3.2.2.1.3 判定

培養細胞にCPEが認められたものを感染とみなし、TCID<sub>50</sub>を算出する。

検体のウイルス含有量は、1mL中10<sup>7.0</sup>TCID<sub>50</sub>以上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は、そのウイルス含有量とする。

#### 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、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日間回転又は静置培養し、観察する。

#### 3.2.2.2.3 判定

培養細胞にCPEが認められたものを感染とみなし、TCID<sub>50</sub>を算出する。

検体のウイルス含有量は、1mL中10<sup>8.0</sup>TCID<sub>50</sub>以上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は、その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

猫腎継代細胞浮遊液を小試験管に0.5mLずつ分注し、37℃で約24時間培養し、細胞層を約50%形成させたもの又は猫腎継代細胞浮遊液を用いる。

###### 3.2.2.3.2 試験方法

試料の0.1mLずつをそれぞれ4本以上の培養細胞に接種し、37℃で60分間吸着後、細胞増殖用培養液を加え、37℃で静置培養する。

培養細胞が完全に単層を形成した後、1.0mLのウイルス増殖用培養液と交換し、37℃で接種後10日間回転培養した後、1 vol%豚赤血球浮遊液を0.2mL加え、4℃で一夜静置し観察する。ただし、農林水産大臣が特に認めた場合は、その試験方法とする。

#### 3.2.2.3.3 判定

赤血球の凝集を認めたものを感染とみなし、TCID<sub>50</sub>を算出する。

検体のウイルス含有量は1mL中10<sup>5.5</sup>TCID<sub>50</sub>以上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は、そのウイルス含有量とする。

#### 3.3 原液の試験

##### 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

濃縮前の不活化ウイルス浮遊液について本試験を実施してもよい。

###### 3.3.2.1 猫ウイルス性鼻気管炎ウイルス不活化試験

###### 3.3.2.1.1 試験材料

###### 3.3.2.1.1.1 試料

検体をトライトン除去処理(付記2)したもの又は検体2mL以上を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。

#### 3.3.2.1.1.2 培養細胞

猫腎継代細胞を用いる。

#### 3.3.2.1.2 試験方法

試料を25cm<sup>2</sup>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用いて細胞を2回洗浄後、ウイルス増殖用培養液を加え、37 で10日間培養し、観察する。

#### 3.3.2.1.3 判定

培養細胞にCPEを認めないとき、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。

#### 3.3.2.2 猫カリシウイルス不活化試験

##### 3.3.2.2.1 試験材料

###### 3.3.2.2.1.1 試料

検体2mL以上を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。

###### 3.3.2.2.1.2 培養細胞

猫腎継代細胞を用いる。

###### 3.3.2.2.2 試験方法

試料を25cm<sup>2</sup>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用いて細胞を2回洗浄後、ウイルス増殖用培養液を加え、37 で10日間培養し、観察する。

###### 3.3.2.2.3 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。

試料に活性ウイルスを認めてはならない。

#### 3.3.2.3 猫汎白血球減少症ウイルス不活化試験

##### 3.3.2.3.1 試験材料

###### 3.3.2.3.1.1 試料

検体の2mL以上を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。

###### 3.3.2.3.1.2 培養細胞

猫腎継代細胞を細胞増殖用培養液（付記3）で、 $3 \times 10^5$ 万個/mLに浮遊させたものを用いる。

###### 3.3.2.3.2 試験方法

試料の全量及び細胞増殖用培養液に浮遊させた猫腎継代細胞を同時に培養面積25cm<sup>2</sup>以上の培養びんで37 で培養する。細胞が単層を形成した後、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、これに等量のホウ酸緩衝食塩液（付記4）を加える。さらに、この混合液と等量のVAD6.0液（付記5）で調整した0.3～0.5vol%豚赤血球浮遊液を加え、凝集の有無を調べる。

###### 3.3.2.3.3 判定

培養細胞にCPE、培養液に赤血球の凝集を認めないとき、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。

#### 3.4 三種混合原液の試験

##### 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 ホルマリン定量試験

適当と認められた方法で検体を処理したものを試料とし、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。ただし、小分製品についてホルマリン定量試験を実施する場合には、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、固有の色調及び粘稠性をもつ均質な液体でなければならず、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 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。

#### 3.5.3 ホルマリン定量試験

試験品又は、適当と認められた方法で試験品を処理したものを試料とし、一般試験法のホルマリン定量試験を準用して試験するとき、ホルマリン含有量は0.2vol%以下でなければならない。

#### 3.5.4 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。ただし、本試験を行うことができない場合は、3.5.5の試験を行う。

#### 3.5.5 毒性限度確認試験

一般試験法の毒性限度確認試験法1を準用して試験するとき、適合しなければならない。

#### 3.5.6 安全試験

##### 3.5.6.1 試験材料

##### 3.5.6.1.1 注射材料

試験品を注射材料とする。

##### 3.5.6.1.2 試験動物

体重約1kgの猫、6か月齢未満の猫又はこれと同等の感受性を有する動物を用いる。

##### 3.5.6.2 試験方法

注射材料を2頭には5頭分ずつを頸部皮下に、2頭には2頭分ずつを内股部筋肉内に注射し、10日間観察をする。ただし、農林水産大臣が特に認めた場合は、その試験方法とする。

##### 3.5.6.3 判定

観察期間中、異常を認めてはならない。

#### 3.5.7 力価試験

##### 3.5.7.1 猫ウイルス性鼻気管炎力価試験

##### 3.5.7.1.1 試験材料

##### 3.5.7.1.1.1 注射材料

試験品を注射材料とする。

##### 3.5.7.1.1.2 試験動物

体重約100gのラットを用いる。

##### 3.5.7.1.1.3 培養細胞

猫腎継代細胞を用いる。

##### 3.5.7.1.1.4 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を用いる。

##### 3.5.7.1.2 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1頭分ずつを試験群の筋肉内に注射し、3週間後に試験群及び対照群から採血するか、又は2回目の注射を行い7日後に採血する。得られた各個体の血清について中和試験を行う。

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倍に希釈した後、更に2又は4倍階段希釈する。1回注射の場合、各希釈血清と0.05mL中に約60PFUを含む試験用ウイルスとを等量混合し、37℃で60分間処理し、2回注射の場合、各希釈血清と0.2mL中に約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。1回注射の場合、各混合液0.05mLずつを、2回注射の場合、各混合液0.2mLずつを2枚の培養細胞に接種し、37℃で60分間吸着した後、混合液を除き、第1次重層寒天培地（付記6）を重層し、37℃5 vol%炭酸ガス下で3～4日間培養する。培養後、更に第2次重層寒天培地（付記7）を重層し、37℃で24時間培養する。

#### 3.5.7.1.3 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、1回注射の場合すべて8倍以上でなければならず、2回注射の場合幾何平均値で16倍以上でなければならない。いずれの場合も、対照群では、4倍未満でなければならない。

#### 3.5.7.2 猫カリシウイルス感染症力価試験

##### 3.5.7.2.1 試験材料

###### 3.5.7.2.1.1 試験動物

3.5.7.1の試験に用いた動物を用いる。

###### 3.5.7.2.1.2 中和試験用ウイルス

猫腎継代細胞で増殖させた猫カリシウイルスを用いる。

###### 3.5.7.2.1.3 培養細胞

猫腎継代細胞を用いる。

##### 3.5.7.2.2 試験方法

3.5.7.1.2で得られた各個体の血清について中和試験を実施する。

各個体の血清を非働化し、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0.1mL中約200TCID<sub>50</sub>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。各混合液0.1mLずつをそれぞれ4本（穴）の培養細胞に接種し、37℃で60分間静置した後、混合液を除き、ウイルス増殖用培養液を加え、37℃で7日間回転又は静置培養する。

##### 3.5.7.2.3 判定

CPEを阻止したものを陽性とし、中和抗体価をED<sub>50</sub>で求める。

試験群の中和抗体価は、1回注射の場合5匹中4匹以上が32倍以上でなければならず、2回注射の場合幾何平均値で16倍以上でなければならない。いずれの場合も、対照群では、2倍未満でなければならない。

#### 3.5.7.3 猫汎白血球減少症力価試験

##### 3.5.7.3.1 試験材料

###### 3.5.7.3.1.1 注射材料

試験品を注射材料とする。

###### 3.5.7.3.1.2 試験動物

体重約100gのラットを用いる。

###### 3.5.7.3.1.3 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8）を用いる。

##### 3.5.7.3.2 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臀部筋肉内に注射し、3週後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で処理した後、2倍段階希釈する。各希釈血清に8単位の赤血球凝集抗原を加え、常温で60分間処理し、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。

##### 3.5.7.3.3 判定

赤血球凝集の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128倍以上又はすべて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。

#### 4 貯法及び有効期間

有効期間は、1年間とする。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。

##### 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 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 トライトン除去処理

###### (1) ビーズの洗浄

ビーズ30gにメタノール200mLを加え、常温で15分間攪拌洗浄後、ガラスろ過器上にビーズを集め、500mLのメタノールと精製水1,000mLで洗浄する。更にビーズをカラムに入れ、2,000mLの精製水で長時間かけて洗浄する。洗浄したビーズは、水中に入れて2~5で保存する。

###### (2) 除去方法

0.01mol/Lリン酸カリウム液(pH7.2)で試料を2~5 一夜透析する。透析した試料2 mLに洗浄したビーズ0.6gを加え5 で120分間攪拌し、180G、10分間遠心して上清を得る。

##### 付記3 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4 ホウ酸緩衝食塩液

1,000mL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

水酸化ナトリウム液でpHを9.0に調整する。

##### 付記5 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

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 6 第 1 次重層寒天培地

1,000mL中

寒天	7 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
F 12培地	残 量

炭酸水素ナトリウムでpHを7.1~7.3に調整する。

必要最少量の抗生物質を加えてもよい。

付記 7 第 2 次重層寒天培地

第 1 次重層寒天培地に0.5w/v%のニュートラルレッド液を 2 vol% となるように加えたもの

付記 8 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液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