

猫ウイルス性鼻気管炎・猫カリシウイルス感染症3価・ 猫汎白血球減少症・猫白血病（組換え型）混合（油性ア ジュバント加）不活化ワクチン

平成22年3月3日（告示第395号） 新規追加

猫ウイルス性鼻気管炎ウイルス、3種類の猫カリシウイルス及び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不活化したもの及び組換えDNA技術を応用して製造された猫白血病ウイルスのエンベロープ糖蛋白70（以下「gp70」という。）を精製したものを混合し、油性アジュバントを添加したワクチンである。

1 小分製品の試験

1.1 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。

1.2 異常毒性否定試験

一般試験法の異常毒性否定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。

1.3 力価試験

1.3.1 猫ウイルス性鼻気管炎力価試験

1.3.1.1 試験材料

1.3.1.1.1 注射材料

試験品を注射材料とする。

1.3.1.1.2 試験動物

体重約100gのラットを用いる。

1.3.1.1.3 培養細胞

猫腎継代細胞を用いる。

1.3.1.1.4 中和試験用ウイルス

猫腎継代細胞で増殖させた猫ウイルス性鼻気管炎ウイルスを用いる。

1.3.1.2 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0.5mLずつを試験群の殿部筋肉内に注射し、3週間隔で2回注射する。第2回注射後7日目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中和試験を行う。

血清を非働化し、ウイルス増殖用培養液（付記1）で4倍階段希釈する。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。各混合液0.2mLずつを2枚の培養細胞に接種し、37℃で60分間静置した後、混合液を除き、第1次重層寒天培地（付記2）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3）を重層し、37℃で24時間培養する。

1.3.1.3 判定

被検血清のブラック数の平均値がウイルス対照のブラック数の平均値の50%以下に減少し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、幾何平均値で16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。

1.3.2 猫カリシウイルス感染症力価試験

1.3.2.1 試験材料

1.3.2.1.1 試験動物

1.3.1の試験に用いた動物を用いる。

1.3.2.1.2 培養細胞

猫腎継代細胞を用いる。

1.3.2.1.3 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のそれぞれの製造用株を用いる。

1.3.2.2 試験方法

1.3.1.2の試験方法で得られた各個体の血清について、それぞれの中和試験用ウイルスで中和試験を行う。

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200TCID₅₀を含む中和試験用ウイルス液とを等量混合し、37°Cで60分間処理する。各混合液0.1mLずつをそれぞれ4本の培養細胞に接種し、37°C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°Cで7日間培養し、観察する。

1.3.2.3 判定

CPEを阻止したものを陽性とし、中和抗体価をED₅₀で求める。

試験群のそれぞれの株に対する中和抗体価は、すべての個体で16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。

1.3.3 猫汎白血球減少症力価試験

1.3.3.1 注射材料

試験品を注射材料とする。

1.3.3.1.1 試験動物

体重約100gのラットを用いる。

1.3.3.1.2 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4）を用いる。

1.3.3.2 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0.5mLずつを試験群の殿部筋肉内に注射し、3週後に試験群及び対照群から得られた各個体の血清を用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、牛血清アルブミン加ホウ酸緩衝食塩液（付記5）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1時間処理し、VAD6.0液（付記6）で調整した0.5vol%豚赤血球浮遊液を加え、2～5°Cで一夜処理し、赤血球凝集の有無を観察する。

1.3.3.3 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128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。

1.3.4 猫白血病力価試験

1.3.4.1 試験材料

1.3.4.1.1 試験動物

1.3.1の試験に用いた動物を用いる。

1.3.4.1.2 抗原固相化プレート

gp70精製抗原（付記7）を炭酸緩衝液（付記8）で希釈し、96穴プレートの各穴に50μLずつ加え、37°Cで60分間反応させ、洗浄液（付記9）で洗浄し、更に2w/v%牛血清アルブミン加洗浄液を各穴へ200μLずつ加え、37°Cで60分間反応させ、洗浄液で洗浄したのものを用いる。

1.3.4.2 試験方法

1.3.1.2の試験方法で得られた各個体の血清について酵素抗体反応（以下「ELISA」という。）を行う。

2 w/v %牛血清アルブミン加洗浄液で100倍に希釈した非働化被検血清と、参照陽性血清（付記10）及び参照陰性血清（付記11）を抗原固相化プレートの穴にそれぞれ4穴、50 μ Lずつ加え、37°Cで1時間反応させた後、洗浄液で洗浄する。各穴に酵素標識抗体（付記12）を50 μ Lずつ加え、37°Cで1時間反応させた後、洗浄液で洗浄する。基質液（付記13）を各穴に100 μ Lずつ加え、遮光して25°Cで30分間反応させた後、反応停止液（付記14）を50 μ Lずつ加えて反応を停止させ、各穴の吸光度を主波長492nm、副波長630nmで測定する。

1.3.4.3 判定

4穴の吸光度の最高値と最低値を除いた2穴の値の平均値を吸光度値とする。参照陽性血清の吸光度値を O.D. p、参照陰性血清の吸光度値を O.D. n、試験群の血清の吸光度値を O.D. v、対照群の血清の吸光度値を O.D. c とするとき、試験群の 80 %以上が $1 < \text{O.D. v} / \text{O.D. p}$ でなければならない。また、対照群では $\text{O.D. c} / \text{O.D. n} \leq 2$ でなければならない。

2 中間製品の試験

2.1 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不活化試験

2.1.1 試験材料

2.1.1.1 試料

各ウイルス原液の混合液をトライトン除去処理（付記15）し、これを試料とする。

2.1.1.2 培養細胞

猫腎継代細胞を用いる。

2.1.2 試験方法

試料の全量及び細胞増殖用培養液（付記16）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 °C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と交換し、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、これに等量の牛血清アルブミン加ホウ酸緩衝食塩液を加える。さらに、この混合液と等量の VAD6.0 液で調整した0.5v01%豚赤血球浮遊液を加え、凝集の有無を観察する。

2.1.3 判定

培養細胞に CPE、培養液に赤血球の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。

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 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（付記 17）	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3 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を2 vol %となるように加えたもの

付記4 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

付記5 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後、水酸化ナトリウム液でpHを9.0に調整する。

付記6 VAD6.0液

1,000mL 中

塩化ナトリウム 8.77 g

無水リン酸二ナトリウム 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7 gp70 精製抗原

組換え大腸菌で発現させたgp70を精製したものであり、-20℃に保存する。

本抗原を用いてELISAを実施したときの吸光度値が、参照陽性血清で0.6～0.9、参照陰性血清で0.1以下の実測値を示すように炭酸緩衝液で希釈して使用する。

付記8 炭酸緩衝液

1,000mL 中

炭酸ナトリウム 1.59 g

炭酸水素ナトリウム 2.93 g

水 残量

pHは9.6であり、4℃に保存し、1週間以内に使用する。

付記9 洗浄液

1,000mL 中

塩化ナトリウム 8.0 g

塩化カリウム 0.2 g

リン酸二ナトリウム 0.2 g

リン酸水素二ナトリウム、無水 1.15 g

ポリソルベート20 0.5 mL

水

残量

付記10 参照陽性血清

gp70 精製抗原で免疫したラットの血清を 100 倍に希釈したもので、抗原固相化プレートを用いて ELISA を実施したとき、吸光度値が 0.6 ~ 0.9 を示すもの

付記11 参照陰性血清

非免疫ラットの血清を 100 倍に希釈したもので、抗原固相化プレートを用いて ELISA を実施したとき、吸光度値が 0.1 以下を示すもの

付記12 酵素標識抗体

ペルオキシダーゼ標識抗ラット IgG(H +L)抗体で抗原固相化プレートを用いて ELISA を実施したとき、参照陽性血清の吸光度値が 0.6 ~ 1.0、参照陰性血清の吸光度値が 0.1 以下を示すように調整したもの

付記13 基質液

o-フェニレンジアミン二塩酸塩 10mg をリン酸クエン酸緩衝液（付記 18）25mL に溶解したものであり、遮光保存する。使用直前に過酸化水素水を 10 μ L 添加して使用する。

付記14 反応停止液

濃硫酸 56.1mL を水 440mL 中に攪拌しながら溶解し、最終的に全体量を 500mL に調整したもの

付記15 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、室温で15分間攪拌洗浄後、ガラスろ過器上にビーズを集め、500mL のメタノールと水 1,000mL で洗浄する。さらに、ビーズをカラムに入れ、2,000mL の水で長時間洗浄する。洗浄したビーズは、水中に入れて 2 ~ 5 $^{\circ}$ C で保存する。

(2) 0.01mol/L リン酸カリウム液 (pH7.2) で試料を 4 $^{\circ}$ C 一夜透析する。透析した試験品 2 mL に洗浄したビーズ 0.6g を加え 5 $^{\circ}$ C で 120 分間攪拌し、180G、10 分間遠心して上清を得る。

付記16 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

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17 F12 培地

適当と認められた品質の液体製品

付記18 リン酸クエン酸緩衝液

1,000mL 中

クエン酸（無水）

4.67 g

リン酸水素二ナトリウム十二水和物
水
pH を 5.0 に調整する。

19.95 g
残量