

抗猫ウイルス性鼻気管炎ウイルス・抗猫カリシウイルス混合抗体（組換え型）

平成 18 年 11 月 10 日制定（農水省告示 1532 号）

1 定義

猫ウイルス性鼻気管炎ウイルス及び猫カリシウイルスに対して中和作用を有するそれぞれのマウスモノクローナル抗体の可変領域遺伝子と、猫免疫グロブリンの定常領域遺伝子を組み合わせたキメラ抗体遺伝子を発現するマウスミエローム細胞を培養増殖させて得た抗体を混合し、凍結乾燥したものである。

2 製法

2.1 抗体産生細胞

2.1.1 抗猫ウイルス性鼻気管炎ウイルスマウス-猫キメラ抗体産生細胞

定常領域の遺伝子を猫肝細胞から単離し、可変領域の遺伝子を猫ヘルペスウイルス 1 型をマウスに免疫した後、組換え DNA 技術により単離する。これらの遺伝子をマウスミエローム細胞に導入して産生細胞を作製する。

2.1.2 抗猫カリシウイルスマウス-猫キメラ抗体産生細胞

定常領域の遺伝子は猫肝細胞から単離し、可変領域の遺伝子は猫カリシウイルスを中和する抗体を産生する細胞から組換え DNA 技術により単離する。これらの遺伝子をマウスミエローム細胞に導入して作製した産生細胞を用いる。

2.2 製造用材料

2.2.1 抗猫ウイルス性鼻気管炎ウイルスマウス-猫キメラ抗体

2.2.1.1 マスターセル

抗体産生細胞を培養し、分注したものをマスターセルとする。マスターセルは、-100 以下で保存する。

2.2.1.2 ワーキングセル

マスターセルを融解後、培養し、分注したものをワーキングセルとする。ワーキングセルは、-100 以下で保存する。

ワーキングセルについて、3.1 の試験を行う。

2.2.2 抗猫カリシウイルスマウス-猫キメラ抗体

2.2.2.1 マスターセル

抗体産生細胞を培養し、分注したものをマスターセルとする。マスターセルは、-100以下で保存する。

2.2.2.2 ワーキングセルバンク

マスターセルを融解後、培養し、分注し、液体窒素タンク内に保存したものをワーキングセルとする。

ワーキングセルについて、3.1 の試験を行う。

2.2.3 培養液

適当と認められた培養液を用いる。

2.3 原液

2.3.1 抗猫ウイルス性鼻気管炎ウイルスマウス-猫キメラ抗体原液

2.3.1.1 培養

ワーキングセルを徐々に拡張して培養を行い、更にファーメンターによる大量培養を行う。最終ファーメンターにおける培養液を本培養液とする。

本培養液について、3.2 の試験を行う。

2.3.1.2 精製

本培養液から細胞を除去した後、限外ろ過膜で濃縮する。その濃縮液を適当と認められる方法で精製濃縮を行った後、適当と認められた安定剤を含む溶液で透析調製したものを原液とする。

原液について、3.3 の試験を行う。

2.3.2 抗猫カリシウイルスマウス-猫キメラ抗体原液

2.3.2.1 培養

ワーキングセルを徐々に拡張して培養を行い、更にファーメンターによる大量培養を行う。最終ファーメンターにおける培養液を本培養液とする。

本培養液について、3.2 の試験を行う。

2.3.2.2 精製

本培養液から細胞を除去した後、限外ろ過膜で濃縮する。その濃縮液を適当と認められる方法で精製濃縮を行った後、透析により適当と認められた安定剤及び等張化剤を添加したものを原液とする。

原液について、3.3 の試験を行う。

2.4 最終バルク

抗猫ウイルス性鼻気管炎ウイルスマウス-猫キメラ抗体原液及び抗猫カリシウイルスマウス-猫キメラ抗体の原液を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、凍結乾燥し、小分製品とする。

小分製品について、3.4 の試験を行う。

3 試験法

3.1 ワーキングセルの試験

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 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。

3.1.3 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 2.1 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。

3.1.4 増殖確認試験

無血清培地を用いてワーキングセルの培養を行うとき、最高細胞密度が 5×10^5 細胞/mL 以上でなければならない。

3.1.5 抗体産生量確認試験

無血清培地を用いてワーキングセルの培養を行うとき、抗体産生量は $15 \mu\text{g/mL}$ 以上でなければならない。

3.1.6 発現たん白質確認試験

培養上清を精製し、SDS ポリアクリルアミドゲル電気泳動を行うとき、主要たん白質ペプチドの分子量は、約 50 及び 27kDa でなければならない。

3.2 本培養液の試験

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。

3.3 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 純度試験

検体を液体クロマトグラフ法で試験するとき、主要なピークが 90 %以上でなければならない。

3.4 小分製品の試験

3.4.1 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。

3.4.2 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。

3.4.3 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。

3.4.4 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 1.2 及び 2.6.1 を準用して試験するとき、適合しなければならない。

3.4.5 蛋白窒素定量試験

一般試験法の蛋白窒素定量法を準用して試験するとき、試験品 1 mL 中のたん白質含量は 18 ~ 23mg でなければならない。ただし、沸騰浴中での 15 分間の加熱を省き、代わりに室温に 15 分間放置する。

3.4.6 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。

3.4.7 特異性確認試験

3.4.7.1 試験材料

試験品を生理食塩液で 40 倍に希釈した試料、抗猫 IgG 血清（付記 1）、精製猫 IgG（付記 2）、精製マウス IgG（付記 3）及びアガロース平板（付記 4）を用いる。

3.4.7.2 試験方法

抗猫 IgG 血清をアガロース平板の中心の穴に、試料、精製猫 IgG 及び精製マウス IgG を周囲の穴にそれぞれ 12 μ L ずつ満たし、湿度を保ちながら、室温で水平に静置して 18 時間反応させる。

3.4.7.3 判定

試料は、抗猫 IgG 血清との間に明瞭な 1 本の沈降線を生じなければならず、抗猫 IgG 血清と精製猫 IgG 間に形成する沈降線と互いに融合しなければならない。また、精製マウス IgG と抗猫 IgG 血清及び試料間には沈降線を生じてはならない。

3.4.8 純度試験

試験品を液体クロマトグラフ法で試験するとき、主要なピークが 90 %以上でなければならない。

3.4.9 力価試験

3.4.9.1 猫ウイルス性鼻気管炎力価試験

3.4.9.1.1 試験材料

3.4.9.1.1.1 試料

試験品をウイルス増殖用培養液（付記 5）で 2,000 倍希釈後 4 倍階段希釈し、各段階の希釈液を試料とする。

3.4.9.1.1.2 培養細胞

CRFK 細胞を用いる。

3.4.9.1.1.3 中和試験用ウイルス

CRFK 細胞で培養させた猫ウイルス性鼻気管炎ウイルスを用いる。

3.4.9.1.2 試験方法

試料と 100 μ L 中に約 100PFU を含む中和試験用ウイルス液を等量混合し、2 ~ 5 で 24 時間

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を等量混合し、同様に2～5で24時間処理したものをウイルス対照とする。各混合液100μLずつを培養細胞の2枚に接種し、37℃、5 vol %炭酸ガス下で60分間吸着後、混合液を除去し、第1次重層寒天培地（付記6）を重層する。37℃、5 vol %炭酸ガス下で4日間培養後、第2次重層寒天培地（付記7）を重層し、37℃、5 vol %炭酸ガス下で更に24時間培養し、観察する。

3.4.9.1.3 判定

試料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%以下に減少した試料の最高希釈倍数で中和抗体価とする。中和抗体価は8,000倍以上でなければならない。

3.4.9.2 猫カリシウイルス感染症力価試験

3.4.9.2.1 試験材料

3.4.9.2.1.1 試料

試験品を細胞増殖用培養液（付記8）で2倍階段希釈し、各段階の希釈液を試料とする。

3.4.9.2.1.2 培養細胞

CRFK細胞を用いる。

3.4.9.2.1.3 中和試験用ウイルス

CRFK細胞で増殖させた猫カリシウイルスC-14株を用いる。

3.4.9.2.2 試験方法

試料と50μL中に約100TCID₅₀を含む中和試験用ウイルス液を等量混合し、37℃、5 vol %炭酸ガス下で60分間処理する。細胞増殖用培養液（付記10）で5×10⁵細胞/mLに調整した細胞浮遊液100μLずつを添加し、37℃、5 vol %炭酸ガス下で4日間培養し、観察する。

3.4.9.2.3 判定

CPEを阻止したものを陽性として中和抗体価をED₅₀で求める。中和抗体価は128倍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、3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 抗猫IgG血清

山羊で作製した抗猫IgG-Fcフラグメント血清で、動物医薬品検査所が適当と認めた濃度に調整したもの

付記2 精製猫IgG

猫血清中のIgG画分のみに精製したもので、動物医薬品検査所が適当と認めた濃度に調整したもの

付記3 精製マウスIgG

マウス血清中のIgG画分のみに精製したもので、動物医薬品検査所が適当と認めた濃度に調整したもの

付記4 アガロース平板

緩衝液（付記9）100mLに、アガロースを1.0w/v%及びマクロゴール6,000を3.0w/v%となるように溶かした後、スライドガラス上に注加し、凝固させた後、直径4mmの穴を3mmの間隔で4個開けた平板である。

付記5 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	2.95g
	牛胎子血清	20 mL
	イーグル MEM	9.5 g
	水	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	第 1 次重層寒天培地	
	1,000 mL 中	
	トリプトース・ホスフェイト・ブロス	2.95g
	牛胎子血清	20 mL
	寒天	7 g
	F12 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	
	1,000 mL 中	
	トリプトース・ホスフェイト・ブロス	2.95g
	ニュートラルレッド	0.2 g
	寒天	7 g
	F12 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 8	細胞増殖用培養液	
	1,000 mL 中	
	トリプトース・ホスフェイト・ブロス	2.95g
	牛胎子血清	50 mL
	イーグル MEM	9.5 g
	水	残 量
	炭酸水素ナトリウムで pH を 7.0 ~ 7.2 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	緩衝液	
	1,000mL 中	
	バルビタールナトリウム	7.364g
	酢酸ナトリウム	4.861g
	塩化ナトリウム	2.923g
	水	残 量
	1 mol/L の塩酸で pH を 7.0 に調整する。 5 w/v % アジ化ナトリウム溶液を 1 mL 加える。	