

改正後	改正前
<p>ワクチン（シードロット製剤）の部</p> <p>（削る）</p>	<p>ワクチン（シードロット製剤）の部</p> <p><u>猫ウイルス性鼻気管炎・猫カリシウイルス感染症 2 価・猫汎白血球減少症混合ワクチン（シード）</u></p> <p><u>動生剤基準のシードロット規格に適合した弱毒猫ウイルス性鼻気管炎ウイルス及び同規格に適合した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並びに同規格に適合した 2 種類の猫カリシウイルスをそれぞれ同規格に適合した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を混合し、凍結乾燥したワクチンである。</u></p> <p><u>1 小分製品の試験</u></p> <p><u>1.1 無菌試験</u> <u>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。</u></p> <p><u>1.2 ウイルス含有量試験</u></p> <p><u>1.2.1 猫ウイルス性鼻気管炎ウイルス含有量試験</u></p> <p><u>1.2.1.1 試験材料</u></p> <p><u>1.2.1.1.1 試料</u> <u>試験品中の猫汎白血球減少症ウイルスを抗猫汎白血球減少症ウイルス血清（付記 1）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（付記 2）で 10 倍階段希釈し、各段階の希釈液を試料とする。</u></p> <p><u>1.2.1.1.2 培養細胞</u> <u>猫腎継代細胞を用いる。</u></p> <p><u>1.2.1.2 試験方法</u> <u>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。</u></p> <p><u>1.2.1.3 判定</u> <u>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^{4.9} TCID₅₀ 以上でなければならない。</u></p> <p><u>1.2.2 猫汎白血球減少症ウイルス含有量試験</u></p> <p><u>1.2.2.1 試験材料</u></p> <p><u>1.2.2.1.1 試料</u> <u>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（付記 3）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。</u></p>

1.2.2.1.2 培養細胞

猫腎継代細胞を用いる。

1.2.2.2 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(付記4)を加え、更にこの混合液とVAD6.0液(付記5)により濃度を調整した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。

1.2.2.3 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^{3.0}TCID₅₀以上でなければならない。

1.3 異常毒性否定試験

一般試験法の異常毒性否定試験により試験を行い、これに適合しなければならない。

1.4 力価試験

1.4.1 猫カリシウイルス感染症力価試験

1.4.1.1 試験材料

1.4.1.1.1 試料

試験品を試料とする。

1.4.1.2 試験方法

96穴ELISA用マイクロプレート各穴に捕捉用抗猫カリシウイルス抗体(付記6)を120μLずつ加え、5℃で1夜静置後、TNE緩衝液(付記7)300μLで1回洗浄して固相化プレートとする。

固相化プレートの各穴にELISA用緩衝液(付記8)を100μLずつ加える。最初の列の2穴ずつに試料及び猫カリシウイルス抗原量定量ELISA参照品(付記9)を100μLずつ加えて2倍階段希釈し、37℃で3時間反応させる。TNE緩衝液300μLで1回洗浄した後、猫カリシウイルス抗原定量ELISA用標識モノクローナル抗体(付記10)を100μLずつ各穴に加え、37℃で1時間静置する。TNE緩衝液300μLで3回洗浄した後、全穴に基質液(付記11)を100μLずつ加え、遮光して20℃で30分間反応させる。反応停止液(付記12)を50μLずつ加え、主波長450nm及び補正波長630nmの2波長で吸光度(OD)を測定する。

以下の計算式によりOD₅₀を算出し、OD₅₀を示す検体の希釈倍数を抗原量としてELISA単位(log10)で表す。

$$OD_{50} = (OD_{max} + OD_{min}) / 2$$

OD_{max}: 参照品の最大ODの平均

OD_{min}: 参照品の最低ODの平均

$$\text{抗原量} (\log 2) = (OD_{50} - \text{定数}) / \text{傾き}$$

定数及び傾き: ODと抗原希釈倍数の対数についてOD₅₀を挟む2点の回帰直線の定数及び傾き

上記の計算式で算出した抗原量(log2)の値をELISA単位(log10)に換算する。

1.4.1.3 判定

参照品が所定の抗原量を示すとき、試験品の抗原量は、 $2.0\log_{10}$ ELISA 単位以上でなければならない。

付記 1 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兎又はモルモットの血清であって、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 2 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
イーグル培養液 (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 3 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又はモルモットの血清であって、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 4 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 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後、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
リン酸水素二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 6 捕捉用抗猫カリシウイルス抗体
猫を猫カリシウイルス G1 株で免疫して得た血清であって、炭酸ナトリウム緩衝液 (付記 13) で至適濃度に希釈して使用する。- 20 °C に保存し、凍結融解は避ける。

付記 7 TNE 緩衝液

1,000mL 中	
塩化ナトリウム	8.77 g
トリス	1.21 g
ポリソルベート 20	1 mL
チメロサル	0.02 g
水	残量

pH を 7.5 ± 0.2 に調整する。

付記 8 ELISA 用緩衝液

1,000mL 中	
トリス	2.42 g
塩化ナトリウム	8.77 g
牛血清アルブミン	10.0 g
ポリソルベート 20	0.5 mL
水	残量

pH を 7.2 に調整する。

付記 9 猫カリシウイルス抗原定量 ELISA 参照品
猫カリシウイルス G1 株又は 431 株を含有する濃縮精製抗原、又は凍結乾燥ワクチン (G1 株及び 431 株) を注射用水で溶解したもので、抗原量が明らかでないもの。
本 ELISA で抗原量を測定するとき、所定の抗原量を示さなければならない。

付記 10 猫カリシウイルス抗原定量 ELISA 用標識モノクローナル抗体
ペルオキシダーゼ標識抗猫カリシウイルス p66 モノクローナル抗体を用いる。ハイブリドーマ H3-2 1012 E2E を接種したマウスの腹水を精製し、ペルオキシダーゼで標識したもので、ELISA 用緩衝液で希釈して使用する。-20℃に保存し、凍結融解は避ける。

付記 11 基質液
本 ELISA に適当なテトラメチルベンジジン溶液を用いる。

付記 12 反応停止液
1 mol/L 硫酸液

以下 (略)

以下 (略)