

犬パルボウイルス感染症（アジュバント加）不活化ワクチン

1 定義

犬パルボ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てアルミニウムゲル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 名称

犬パルボウイルス K-3i 株又はこれと同等と認められた株

2.1.2 性状

犬に経口的に感染させた場合、嘔吐、下痢、白血球の減少及び発熱等の症状が認められ、犬及び猫由来細胞で核内封入体を伴って増殖し、その培養ウイルス液は豚及び猿の赤血球を凝集する。

2.1.3 継代及び保存

原株及び種ウイルスは、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 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。

2.2.2 培養液

製造に適当と認められた培養液を用いる。

2.3 原液

2.3.1 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。

2.3.2 ウイルスの培養

種ウイルスを培養細胞で培養し、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ろ液、遠心上清又はこれら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 の試験を行う。

2.3.3 不活化及び精製

ウイルス浮遊液をホルマリン又は適当と認められた不活化剤を加えて不活化したもの、又は適当と認められた方法でこれを精製濃縮したものを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。

不活化ウイルス液について、3.3 の試験を行う。

2.3.4 原液の調整

不活化ウイルス液を混合し、又は適当と認められた希釈用液で濃度調整し、原液とする。この場合、適当と認められた安定剤を加えてもよい。

原液について、3.4 の試験を行う。

2.4 最終バルク

原液を混合し、最終バルクとする。この場合、適当と認められたアルミニウムゲルアジュバントを加える。また、適当と認められた保存剤を加えてもよい。

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

個体別培養細胞の 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。

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し、観察するとき、CPE を認めてはならない。

3.1.2 赤血球凝集試験

3.1.1 の試験最終日に採取した培養液を 2 群に分け、0.5vol% 豚赤血球浮遊液及び 0.5vol% モルモット赤血球浮遊液をそれぞれ等量加え 60 分間静置し、観察するとき、赤血球凝集を認めてはならない。

3.2 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 試験材料

3.2.1.1.1 試料

検体をウイルス増殖用培養液（付記 1）又は適当と認められた希釈液で 10 倍階段希釈し、各段階の希釈液を試料とする。

3.2.1.1.2 培養細胞

猫腎継代細胞又は適当と認められた培養細胞を用いる。

3.2.1.2 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 1 ~ 3 日間培養後、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。更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。

3.2.1.3 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^{6.0}TCID₅₀ 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

3.3.2.1 試験材料

3.3.2.1.1 試料

検体 2 mL 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。

3.3.2.1.2 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 4）に浮遊させた猫腎継代細胞を同時に培養面積 25cm² 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と交換し、更に 10 日間観察する。また、必要と認められる場合、10 日目に培養液 2 mL を採取し、それを同様の方法で継代培養し、37℃ で 5 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% 豚赤血球浮遊液を用いて赤血球凝集試験を行う。

3.3.2.3 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。

3.4 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。

3.5 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。

3.5.2 pH 測定試験

一般試験法の pH 測定試験法を準用して試験するとき、pH は、固有の値を示さなければならない。

3.5.3 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。

3.5.4 チメロサル定量試験

チメロサル添加製剤については、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。

3.5.5 ホルマリン定量試験

ホルマリン添加製剤については、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 0.1vol% 以下でなければならない。

3.5.6 アルミニウム定量試験

一般試験法のアルミニウム定量法を準用して試験するとき、アルミニウムの含有量は、1 mL 中固有の値以下でなければならない。

3.5.7 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。

3.5.8 安全試験

3.5.8.1 試験材料

3.5.8.1.1 注射材料

試験品を注射材料とする。

3.5.8.1.2 試験動物

6 か月齢未満の犬を用いる。

3.5.8.2 試験方法

試験動物 2 頭を試験群、1 頭を対照群とする。試験群にそれぞれ 5 頭分の注射材料を注射し、対照群とともに 10 日間観察する。

3.5.8.3 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。

3.5.9 力価試験

3.5.9.1 試験材料

3.5.9.1.1 注射材料

試験品を注射材料とする。

3.5.9.1.2 試験動物

体重 100g のラットを用いる。

3.5.9.1.3 赤血球凝集抗原

犬パルボウイルス赤血球凝集抗原（付記 5）を用いる。

3.5.9.2 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 ずつを試験群の筋肉内に注射し、2 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 倍段階希釈する。各希釈血清に 8 単位の犬パルボ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。

3.5.9.3 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 32 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 pH7.4 ~ 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 pH9.0 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 pH6.0 に調整する。

付記 4 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5 犬パルボウイルス赤血球凝集抗原

犬パルボウイルス Y-1 株又は適当と認められたウイルス株を猫腎継代細胞で増殖させて得た培養上清を不活化したもので、赤血球凝集価が 128 倍以上のもの