

ジステンパー・犬アデノウイルス（２型）感染症混合生ワクチン

1 定義

弱毒ジステンパーウイルス及び弱毒犬アデノウイルス（２型）を培養細胞で増殖させて得たウイルス液を混合し、凍結乾燥したワクチンである。

2 製法

2.1 製造用株

2.1.1 ジステンパーウイルス株

2.1.1.1 名称

弱毒ジステンパーウイルスオンダーステポート株又はこれと同等と認められた株

2.1.1.2 性状

犬に注射しても病原性を示さない。発育鶏卵の漿尿膜上又は感受性のある培養細胞に接種すると、ポック又はCPEを伴って増殖する。

2.1.1.3 継代及び保存

原株及び原種ウイルスは、発育鶏卵又は適当と認められた培養細胞で継代する。

原株の継代は、原種ウイルスの製造又は原株の恒久的な維持以外の目的で行ってはならない。原種ウイルスは、直接原株から連続した工程により製造し、その継代数は3代以内でなければならない。種ウイルスは、原種ウイルスから2代以内に製造しなければならない。

原株及び原種ウイルスは、凍結して - 70 以下又は凍結乾燥して 5 以下で保存する。

種ウイルスは、原種ウイルスからワクチンの製造ごとに用時調製する。

2.1.2 犬アデノウイルス（２型）株

2.1.2.1 名称

弱毒犬アデノウイルス（２型）ディッチフィールド株又はこれと同等と認められた株

2.1.2.2 性状

犬に注射しても病原性を示さない。感受性のある培養細胞に接種すると、CPEを伴って増殖する。

2.1.2.3 継代及び保存

原株及び原種ウイルスは、適当と認められた培養細胞で継代する。

原株の継代は、原種ウイルスの製造又は原株の恒久的な維持以外の目的で行ってはならない。原種ウイルスは、直接原株から連続した工程により製造し、その継代数は3代以内でなければならない。種ウイルスは、原種ウイルスから2代以内に製造しなければならない。

原株及び原種ウイルスは、凍結して - 70 以下又は凍結乾燥して 5 以下で保存する。

種ウイルスは、原種ウイルスからワクチンの製造ごとに用時調製する。

2.2 製造用材料

2.2.1 ジステンパーウイルス

2.2.1.1 培養細胞

犬腎培養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 犬アデノウイルス（２型）

2.2.2.1 培養細胞

犬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。

2.2.2.2 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 ジステンパーウイルス原液

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で培養し、ウイルス増殖の極期に感染材料を採取し、ろ液又は遠心上清を原液とする。

原液について、3.2.1 及び 3.2.2.1 の試験を行う。

2.3.2 犬アデノウイルス（2 型）原液

2.3.2.1 細胞の培養

1 回処理し、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

種ウイルスをそれぞれ培養細胞で培養し、ウイルス増殖の極期に感染材料を採取し、ろ液又は遠心上清を原液とする。

原液について、3.2.1 及び 3.2.2.2 の試験を行う。

2.4 最終バルク

ジステンパーウイルス原液及び犬アデノウイルス（2 型）原液を混合し、適当と認められた希釈液及び安定剤を加え、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、3.3 の試験を行う。

3 試験法

3.1 培養細胞の試験

個別培養細胞のそれぞれ 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、製造に継代細胞が用いられる場合は、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 回洗浄後、0.1vol% モルモット赤血球浮遊液を重層し、60 分間静置後、赤血球吸着の有無を観察するとき、培養細胞に赤血球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、封入体の有無を観察するとき、培養細胞に封入体を認めてはならない。

3.2 原液の試験

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 ジステンパーウイルス含有量試験

3.2.2.1.1 又は 3.2.2.1.2 のいずれかの試験を行う。

3.2.2.1.1 発育鶏卵接種試験

3.2.2.1.1.1 試験材料

3.2.2.1.1.1.1 試料

検体を 2 vol% 馬血清加リン酸緩衝食塩液で 10 倍階段希釈し、各段階の希釈液を試料とする。

3.2.2.1.1.1.2 発育鶏卵

6 ~ 9 日齢のものを用いる。

3.2.2.1.1.2 試験方法

試料 0.2mL ずつをそれぞれ 5 個以上の発育鶏卵の漿尿膜上に接種し、35 ~ 37 で 7 日間培養し、観察する。ただし、特に承認されたものは、その試験法とする。

3.2.2.1.1.3 判定

生存卵の漿尿膜上に特徴的なポックが 2 個以上発現したものを感染卵とみなし、EID₅₀ を算出する。

検体のウイルス含有量は、1 mL 中 10^{4.5}EID₅₀ 以上でなければならない。ただし、特に承認されたものは、そのウイルス含有量とする。

3.2.2.1.2 培養細胞接種試験

3.2.2.1.2.1 試験材料

3.2.2.1.2.1.1 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。

3.2.2.1.2.1.2 培養細胞

Vero 細胞又は適当と認められた培養細胞を用いる。

3.2.2.1.2.2 試験方法

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、35 ~ 37 で 7 ~ 21 日間培養し、観察する。

3.2.2.1.3 判定

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。

検体のウイルス含有量は、1 mL 中 10^{4.5}TCID₅₀ 以上でなければならない。

3.2.2.2 犬アデノウイルス（2 型）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又は適当と認められた培養液で 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

犬腎継代細胞又は適当と認められた培養細胞を用いる。

3.2.2.2 試験方法

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、35 ~ 37 で 7 ~ 10 日間培養し、観察する。

3.2.2.2.3 判定

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。

検体のウイルス含有量は、1 mL 中 10^{6.5}TCID₅₀ 以上でなければならない。ただし、特に承認されたものは、そのウイルス含有量とする。

3.3 小分製品の試験

3.3.1 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又は均質な懸濁液でなければならず、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。

3.3.2 真空度試験

一般試験法の真空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。

3.3.3 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。

3.3.4 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。

3.3.5 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。ただし、原液を含む中間工程でマイコプラズマ否定試験法を実施する場合には、本試験の実施を省略することができる。

3.3.6 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 1.1、2.5.1、2.6.1、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。

ただし、中和用血清は、抗ジステンパーウイルス血清（付記 2）及び抗犬アデノウイルス（2 型）血清（付記 3）をそれぞれ非働化したものを用いる。

3.3.7 ウイルス含有量試験

3.3.7.1 ジステンパーウイルス含有量試験

3.2.2.1 を準用して試験するとき、試験品のウイルス含有量は、1 頭分当たり $10^{3.5}$ EID₅₀ 又は $10^{3.5}$ TCID₅₀ 以上でなければならない。ただし、試験品中の犬アデノウイルス（2 型）を抗犬アデノウイルス（2 型）血清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。

3.3.7.2 犬アデノウイルス（2 型）含有量試験

3.3.7.2.1 試験材料

3.3.7.2.1.1 試料

試験品中のジステンパーウイルスを抗ジステンパーウイルス血清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。

3.3.7.2.1.2 培養細胞

豚腎細胞又は犬腎継代細胞を用いる。

3.3.7.2.2 試験方法

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、35 ~ 37 で 7 日間培養し、観察する。ただし、特に承認されたものは、その試験法とする。

3.3.7.2.3 判定

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、豚腎細胞を用いた場合、1 頭分当たり $10^{5.5}$ TCID₅₀ 以上、また、犬腎継代細胞を用いた場合、1 頭分当たり $10^{4.7}$ TCID₅₀ 以上でなければならない。

3.3.8 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。

3.3.9 安全試験

3.3.9.1 試験材料

3.3.9.1.1 注射材料

試験品を注射材料とする。

3.3.9.1.2 試験動物

6 か月齢未満の犬を用いる。

3.3.9.2 試験方法

試験動物 3 頭を試験群、2 頭を対照群とする。試験群に注射材料 1 頭分を用法に従ってそれぞれ注射し、対照群とともに 4 週間観察する。ただし、特に承認されたものは、その観察期間とする。

3.3.9.3 判定

観察期間中、試験群及び対照群に臨床的な異常を認めてはならない。

3.3.10 力価試験

3.3.10.1 ジステンパー力価試験

3.3.10.1.1 試験材料

3.3.10.1.1.1 試験動物

3.3.9 の試験に用いた動物を用いる。

3.3.10.1.1.2 中和試験用ウイルス

適当と認められたジステンパーウイルス株を用いる。

3.3.10.1.1.3 発育鶏卵又は培養細胞

6 ~ 9 日齢の発育鶏卵又は適当と認められた培養細胞を用いる。

3.3.10.1.2 試験方法

3.3.9 の試験最終日に試験群及び対照群の試験動物から得られた血清について中和試験を行う。各試験群の血清は、それぞれ等量をプールする。

各プール血清を非働化後、2 vol% 馬血清加リン酸緩衝食塩液又は適当と認められた希釈液で 5 倍階段希釈する。各希釈血清と 0.1mL 中約 200EID₅₀又は約 200TCID₅₀の中和試験用ウイルス液とを等量混合し、2 ~ 5 で一夜又は 37 で 60 分間処理する。この各混合液 0.1mL ずつをそれぞれ 5 個以上の発育鶏卵漿尿膜上又は 4 本（穴）以上の培養細胞に接種し、35 ~ 37 で 7 ~ 21 日間培養し、観察する。ただし、特に承認されたものは、その試験法とする。

3.3.10.1.3 判定

培養後、生存卵の漿尿膜を摘出して病変のないもの又は培養細胞の CPE を阻止したものを陽性とし、中和抗体価を ED₅₀ で求める。試験群の中和抗体価は、40 倍以上でなければならない。この場合、対照群では、10 倍以下でなければならない。ただし、特に承認されたものは、その抗体価とする。

3.3.10.2 犬アデノウイルス（2 型）感染症力価試験

3.3.10.2.1 試験動物

3.3.10.2.1.1 試料

3.3.9 の試験に用いた動物を用いる。

3.3.10.2.1.2 中和試験用ウイルス

適当と認められた犬アデノウイルス（2 型）株を用いる。

3.3.10.2.1.3 培養細胞

犬腎継代細胞を用いる。

3.3.10.2.2 試験方法

3.3.9 の試験最終日に試験群及び対照群の試験動物から得られた血清について中和試験を行う。各試験群の血清は、それぞれ等量をプールする。

各プール血清を非働化後、1 vol% 牛胎子血清加リン酸緩衝食塩液又は適当と認められた希釈液で 2 倍階段希釈する。各希釈血清と 0.1mL 中約 200TCID₅₀ の中和試験用ウイルス液とを等量混合し、35 ~ 37 で 60 ~ 90 分間処理する。この各混合液 0.1mL ずつをそれぞれ 4 本（穴）以上の培養細胞に接種し、35 ~ 37 で 7 日間培養し、観察する。ただし、特に承認されたものは、その試験法とする。

3.3.10.2.3 判定

細胞を観察し、CPE を阻止したものを陽性とし、中和抗体価を TCID₅₀ で求める。

試験群の中和抗体価は、128 倍以上でなければならない。この場合、対照群では、10 倍以下でなければならない。ただし、特に承認されたものは、その抗体価とする。

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 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 抗ジステンパーウイルス血清

ジステンパーウイルスで免疫した兔、モルモット又はフェレットの血清で、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 3 抗犬アデノウイルス (2 型) 血清

犬アデノウイルス (2 型) で免疫した兔又はモルモットの血清で、試験品のウイルスを完全に中和する力価を有するもの