

ジステンパー・犬アデノウイルス（２型）感染症・ 犬パラインフルエンザ混合生ワクチン

1 定義

弱毒ジステンパーウイルス、弱毒犬アデノウイルス（２型）及び弱毒犬パラインフルエンザウイルス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スナイダー・ヒル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。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。

2.1.1.3 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。

2.1.2 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型マンハッタン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。

2.1.3 犬パラインフルエンザウイルス株

2.1.3.1 名称

弱毒犬パラインフルエンザウイルス NL-CPI-5 株又はこれと同等と認められた株

2.1.3.2 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増殖し、細胞はモルモット赤血球を吸着する。

2.1.3.3 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

犬腎継代細胞又は製造に相当と認められた培養細胞を用いる。

2.2.1.2 培養液

製造に相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相当と認められた培養細胞を用いる。

2.2.2.2 培養液

製造に相当と認められた培養液を用いる。

2.2.3 犬パラインフルエンザウイルス

2.2.3.1 培養細胞

犬腎継代細胞又は製造に相当と認められた培養細胞を用いる。

2.2.3.2 培養液

製造に相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、その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。

2.3.2.2 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、その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。

2.3.3 犬パラインフルエンザウイルス原液

2.3.3.1 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。

2.3.3.2 ウイルスの培養

種ウイルスを培養細胞で培養し、ウイルス増殖の極期に感染材料を採取し、その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3.2.2.3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、犬アデノウイルス（2型）原液及び犬パラインフルエンザウイルス原液を混合し、適当と認められた希釈剤及び安定剤を加え、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

個体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、製造に継代細胞を用いている場合は、3.1.3の試験を行わなくてもよい。

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 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回洗浄し、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 試験材料

3.2.2.1.1.1 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用液で10倍階段希釈し、各段階の希釈液を試料とする。

3.2.2.1.1.2 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 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、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、1mL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希釈用液で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。

3.2.2.2.2 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、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。

3.2.2.3 犬パラインフルエンザウイルス含有量試験

3.2.2.3.1 試験材料

3.2.2.3.1.1 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希釈用液で 10 倍階段希釈し、各段階の希釈液を試料とする。

3.2.2.3.1.2 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。

3.2.2.3.2 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、37℃ で 10 日間培養する。培養後、培養液を除き、培養液と等量の 0.2vol% モルモット赤血球浮遊液を加え、2 ~ 5℃ で 60 分間静置し、観察する。

3.2.2.3.3 判定

培養細胞に赤血球吸着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。

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均質な液体又は均質な懸濁液でなければならない。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）、抗犬アデノウイルス（2 型）血清（付記 3）及び抗犬パラインフルエンザウイルス血清（付記 4）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

3.3.7.1.1 試験材料

3.3.7.1.1.1 試料

試験品中のジステンパーウイルス以外のウイルスを非働化した各抗血清（付記3及び4）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。

3.3.7.1.1.2 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。

3.3.7.1.2 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、37℃で7～21日間培養し、観察する。

3.3.7.1.3 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。

試験品のウイルス含有量は、1頭分当たり10^{3.5}TCID₅₀以上でなければならない。

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

試験品中の犬アデノウイルス以外のウイルスを非働化した各抗血清（付記2及び4）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

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、37℃で7～10日間培養し、観察する。

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、1頭分当たり10^{5.5}TCID₅₀以上でなければならない。

3.3.7.3 犬パラインフルエンザウイルス含有量試験

3.3.7.3.1 試験材料

3.3.7.3.1.1 試料

試験品中の犬パラインフルエンザ以外のウイルスを非働化した各抗血清（付記2及び3）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。

3.3.7.3.1.2 培養細胞

犬腎継代細胞を用いる。

3.3.7.3.2 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、37℃で10日間培養する。培養後、培養液を除き、培養液と等量の0.2vol%モルモット赤血球浮遊液を加え、2～5℃で60分間静置し、観察する。

3.3.7.3.3 判定

培養細胞に赤血球吸着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^{5.5}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 頭分を皮下にそれぞれ注射し、3 週間後に追加注射する。試験群及び対照群ともに 6 週間観察する。

3.3.9.3 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。

3.3.10 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を用いる。

3.3.10.1.1.3 培養細胞

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の。

各プール血清を非働化し、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 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 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 ~ 21 日間培養し、観察する。

3.3.10.1.3 判定

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。

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 試験材料

3.3.10.2.1.1 試験動物

3.3.9 の試験に用いた動物を用いる。

3.3.10.2.1.2 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の。

各プール血清を非働化し、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 2 又は 5 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 ~ 10 日間培養し、観察する。

3.3.10.2.3 判定

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。

3.3.10.3 犬パラインフルエンザ力価試験

3.3.10.3.1 試験材料

3.3.10.3.1.1 試験動物

3.3.9 の試験に用いた動物を用いる。

3.3.10.3.1.2 中和用ウイルス

適当と認められた犬パラインフルエンザウイルス株を用いる。

3.3.10.3.1.3 培養細胞

犬腎継代細胞を用いる。

3.3.10.3.2 試験方法

3.3.9 の試験最終日に試験群及び対照群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し、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用液で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10日間培養する。マイクロプレートに各希釈列の培養液を取り、等量の0.4vol%のモルモット赤血球浮遊液を加え、十分混和した後、常温で90分間静置し、赤血球凝集の有無を観察する。

3.3.9.3.3 判定

赤血球凝集を阻止したものを陽性とし、ED₅₀で求める。

試験群の中和抗体価は、2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。

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 2.98 g

牛胎子血清 0～30 mL

イーグル MEM 残量

炭酸水素ナトリウムでpHを7.0～7.4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

付記4 抗犬パラインフルエンザウイルス血清

犬パラインフルエンザウイルス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