

猫ウイルス性鼻気管炎・猫カリシウイルス感染症・猫汎白血球減少症混合（アジュバント加）不活化ワクチン

平成 19 年 5 月 18 日（告示第 692 号） 新規追加

1 定義

猫ウイルス性鼻気管炎ウイルス、猫カリシウイルス及び猫汎白血球減少症ウイルスを培養細胞で増殖させて得たウイルス液をそれぞれ不活化したものを混合し、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 猫ウイルス性鼻気管炎ウイルス株

2.1.1.1 名称

猫ウイルス性鼻気管炎ウイルス 605 株又はこれと同等と認められた株

2.1.1.2 性状

猫腎継代細胞に接種すると CPE を伴って増殖する。

2.1.1.3 継代及び保存

原株及び種ウイルスは、猫腎継代細胞又は適当と認められた培養細胞で継代する。

継代は、原株にあつては 3 代以内、種ウイルスにあつては 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°C 以下又は凍結乾燥して 5°C 以下で保存する。

2.1.2 猫カリシウイルス株

2.1.2.1 名称

猫カリシウイルス 255 株及び 2024 株又はこれらと同等と認められた株

2.1.2.2 性状

猫腎継代細胞に接種すると CPE を伴って増殖する。

2.1.2.3 継代及び保存

原株及び種ウイルスは、猫腎継代細胞又は適当と認められた培養細胞で継代する。

継代は、原株にあつては、3 代以内、種ウイルスにあつては、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°C 以下又は凍結乾燥して 5°C 以下で保存する。

2.1.3 猫汎白血球減少症ウイルス株

2.1.3.1 名称

猫汎白血球減少症ウイルス LV 株又はこれと同等と認められた株

2.1.3.2 性状

猫腎継代細胞に接種すると核内封入体を伴って増殖し、その培養液は、豚の赤血球を凝集する。

2.1.3.3 継代及び保存

原株及び種ウイルスは、猫腎継代細胞又は適当と認められた培養細胞で継代する。

継代は、原株にあつては、3 代以内、種ウイルスにあつては 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°C 以下又は凍結乾燥して 5°C 以下で保存する。

2.2 製造用材料

2.2.1 猫ウイルス性鼻気管炎ウイルス

2.2.1.1 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。

2.2.1.2 培養液

製造に適当と認められた培養液を用いる。

2.2.2 猫カリシウイルス

2.2.2.1 培養細胞

猫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 猫汎白血球減少症ウイルス

2.2.3.1 培養細胞

猫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 猫ウイルス性鼻気管炎ウイルス

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に接種し、培養した後、ウイルスの増殖極期に採取した培養液をろ過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、3.2.1 及び 3.2.2.1 の試験を行う。

2.3.1.3 不活化

ウイルス浮遊液にホルマリンを加えてウイルスを不活化する。その後、不活化剤で中和してもよい。これを原液とする。

原液について、3.3.1、3.3.2.1 及び 3.3.3 の試験を行う。

2.3.2 猫カリシウイルス

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

各株の種ウイルスを培養細胞に接種し、培養後、ウイルスの増殖極期に採取した培養液をろ過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、3.2.1 及び 3.2.2.2 の各試験を行う。

2.3.2.3 不活化

各株のウイルス浮遊液にホルマリンを加えてウイルスを不活化する。その後、不活化剤で中和してもよい。これを原液とする。

原液について、3.3.1、3.3.2.2 及び 3.3.3 の試験を行う。

2.3.3 猫汎白血球減少症ウイルス

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に接種し、培養後、ウイルスの増殖極期に採取した培養液をろ過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、3.2.1 及び 3.2.2.3 の試験を行う。

2.3.3.3 不活化

ウイルス浮遊液にホルマリンを加えてウイルスを不活化する。その後、不活化剤で中和してもよい。これを原液とする。

原液について、3.3.1、3.3.2.3 及び 3.3.3 の試験を行う。

2.3.4 原液の混合

猫ウイルス性鼻気管炎ウイルス原液、猫カリシウイルス各株の原液及び猫汎白血球減少症ウイルス原液を混合し、4 種混合原液とする。

4 種混合原液について、3.4 の試験を行う。

2.4 最終バルク

4 種混合原液に、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、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、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

培養細胞の 1 % 以上を対照培養細胞とし、これについて次に掲げる試験を行う。

3.1.1 培養観察

最低 6 cm² 以上の最終継代から 7 日以上培養した 1 本以上の単層の対照培養細胞に適当な細胞学的染色を施し、封入体、異常な数の巨細胞、又は外来因子が原因と考えられるその他の細胞病理学的変化に関して、染色した培養細胞の全体を観察するとき、これらを認めてはならない。

3.1.2 赤血球吸着試験

最低 6 cm² 以上の最終継代から 7 日以上培養した 1 本以上の単層の対照培養細胞をリン酸緩衝食塩液で数回洗浄し、細胞の表面を均等に覆うように 0.2 vol % モルモット及び鶏赤血球浮遊液を重層する。モルモット及び鶏赤血球浮遊液はあらかじめ混合してから対照培養細胞に重層してもよいし、別々に対照培養細胞に重層してもよい。4 で 30 分間静置し、リン酸緩衝食塩液で洗浄した後、赤血球吸着の有無を観察するとき、対照培養細胞に赤血球の吸着を認めてはならない。なお、赤血球吸着の有無が明らかではない場合には、上記の手順を繰り返し、20 ~ 25 で 30 分間静置し、リン酸緩衝食塩液で洗浄した後、再び赤血球吸着の有無を観察する。

3.1.3 無菌試験

0.5 w/v % ビーフエキスを含有する液体チオグリコール酸培地又は 0.5 w/v % ビーフエキスを含有しない液体チオグリコール酸培地及びソイビーン・カゼイン・ダイジェスト培地をそれぞれ試験管 10 本ずつ用意し、検体 1 mL をそれぞれの試験管に接種し、液体チオグリコール酸培地にあっては 30 ~ 35 で 14 日間、ソイビーン・カゼイン・ダイジェスト培地にあっては 20 ~ 25 で 14 日間培養して観察するとき、いずれの試験管にも菌の増殖を認めてはならない。

3.1.4 マイコプラズマ否定試験

3.1.4.1 試験材料

3.1.4.1.1 試料

浮遊細胞液を試料とする。

3.1.4.2 試験方法

3.1.4.2.1 プレート接種法

ハートインフュージョン寒天平板（付記 1）に試料 0.1 mL を接種し、ピペットを使って短く連続的にプレート全体に画線する。試料が培地表面全体に行きわたるようにプレートを傾ける。陽性対照及び未接種陰性対照とともに、高湿度 33 ~ 37 、5 vol % 炭酸ガス下で 14 日間培養する。

3.1.4.2.2 液体培地接種法

100 mL のハートインフュージョンブイヨン（付記2）が入ったフラスコに試料 1 mL を接種し、十分混和した後、陽性対照及び未接種陰性対照とともに、33 ~ 37 で 14 日間培養する。ハートインフュージョン寒天平板を 4 枚用意し、培養 3 日目に培養フラスコから採材した接種材料 0.1 mL を寒天平板の 1 枚に接種する。培養 7 日目、10 日目及び 14 日目においても同様に行う。

3.1.4.3 判定

陽性対照の最低一つの平板に増殖が認められ、陰性対照のいずれにも増殖を認めてはならない。

3.1.5 蛍光抗体法による外来因子検出試験

継代培養から 7 日以上経過した対照培養細胞を、猫汎白血球減少症ウイルス、狂犬病ウイルス、牛ウイルス性下痢ウイルス及びコロナウイルスに対するそれぞれの抗ウイルス標識抗体で染色するとき、特異蛍光を認めてはならない。陽性対照には特異蛍光が認められなければならない。

3.2 ウイルス浮遊液の試験

3.2.1 無菌試験

3.1.3 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 猫ウイルス性鼻気管炎ウイルスの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 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

猫腎継代細胞を用いる。

3.2.2.1.2 試験方法

マイクロプレートに培養細胞を培養し、試料の 0.1mL ずつを、それぞれ 5 穴の培養細胞に接種した後、1 穴当たり 0.1 mL のウイルス含有量試験用培養液（付記3）を加え、5 vol % 炭酸ガス下 37 で 4 日間培養する。

3.2.2.1.3 判定

特徴的な 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^{6.7} TCID₅₀ 以上でなければならない。

3.2.2.2 猫カリシウイルスのウイルス含有量試験

3.2.2.2.1 試験材料

3.2.2.2.1.1 試料

検体を 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

猫腎継代細胞を用いる。

3.2.2.2.2 試験方法

マイクロプレートに培養細胞を培養し、試料の 0.1mL ずつを、それぞれ 5 穴の培養細胞に接種した後、1 穴当たり 0.1 mL のウイルス含有量試験用培養液を加え、5 % 炭酸ガス下 37 で 4 日間培養する。

3.2.2.2.3 判定

特徴的な 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^{7.8} TCID₅₀ 以上でなければならない。

3.2.2.3 猫汎白血球減少症ウイルスの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

検体を試料とする。

3.2.2.3.2 試験方法

マイクロプレートの各穴にリン酸緩衝食塩液を 50 μ L ずつ入れる。1 列目の穴に検体 50 μ L を加え、よく混合し、次の列の穴に 50 μ L 移し入れ、2 倍に希釈された階段希釈列を作製する。最終列から 50 μ L/穴を取り除く。次に、赤血球浮遊液（付記 4）50 μ L を各穴に加え、よく混合した後、4℃ で 2 時間静置する。

3.2.2.3.3 判定

完全な赤血球凝集反応を示す最高希釈倍率を 50 μ L 当たりの赤血球凝集単位（HAU）とする。検体のウイルス含有量は、768 HAU / 50 μ L でなければならない。

3.3 原液の試験

3.3.1 無菌試験

3.1.3 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 猫ウイルス性鼻気管炎ウイルスの不活化試験

3.3.2.1.1 試験材料

3.3.2.1.1.1 試料

検体をピロ亜硫酸ナトリウムでホルムアルデヒドを中和したものを試料とする。

3.3.2.1.1.2 培養細胞

猫腎継代細胞を用いる。

3.3.2.1.2 試験方法

3.3.2.1.2.1 原培養

175cm²の細胞培養びん 4 本に猫腎継代細胞を培養し、単層となったところで不活化試験用培養液（付記 5）を除き、2 本には試料 25mL を、1 本には陽性対照として 10^{3.0} TCID₅₀/mL の猫ウイルス性鼻気管炎ウイルス 0.5mL をそれぞれ接種し、残りの 1 本には何も接種せずに 36℃ で 1 時間静置し、接種したものを除いた後それぞれ 100mL の不活化試験用培養液を加えて 36℃ で 7 日間培養し、細胞を観察する。培養後、- 70℃ で 60 分間凍結した後、36℃ で融解したものを細胞 / 培養液混合物とする。

3.3.2.1.2.2 第 1 回 2 次培養

別に、80cm²の細胞培養びん 4 本に猫腎継代細胞を培養し、単層となったところで不活化試験用培養液を除き、2 本には原培養の細胞 / 培養液混合物 10mL を、1 本には陽性対照として 10^{3.0} TCID₅₀/mL の猫ウイルス性鼻気管炎ウイルス 0.5mL をそれぞれ接種し、残りの 1 本には何も接種せずに 36℃ で 1 時間静置し、接種したものを除いた後、それぞれ 50mL の不活化試験用培養液を加えて 36℃ で 7 日間培養し、細胞を観察する。培養後、- 70℃ で 60 分間凍結した後、36℃ で融解したものを細胞 / 培養液混合物とする。

3.3.2.1.2.3 第 2 回 2 次培養

別に、80cm²の細胞培養びん 4 本に猫腎継代細胞を培養し、単層となったところで不活化試験用培養液を除き、2 本には第 1 回 2 次培養の細胞 / 培養液混合物 10mL を、1 本には陽性対照として 10^{3.0} TCID₅₀/mL の猫ウイルス性鼻気管炎ウイルス 0.5mL をそれぞれ接種し、残りの 1 本には何も接種せずに 36℃ で 1 時間静置し、接種したものを除いた後、それぞれ 50mL の不活化試験用培養液を加えて 36℃ で 7 日間培養し、細胞を観察する。

3.3.2.1.3 判定

観察期間中、ウイルスの CPE を認めてはならない。ただし、陽性対照はウイルスの CPE を認めなければならない。

3.3.2.2 猫カリシウイルスの不活化試験

3.3.2.2.1 試験材料

3.3.2.2.1.1 試料

検体をピロ亜硫酸ナトリウムでホルムアルデヒドを中和したものを試料とする。

3.3.2.2.1.2 培養細胞

猫腎継代細胞を用いる。

3.3.2.2.2 試験方法

3.3.2.2.2.1 原培養

175cm²の細胞培養びん4本に猫腎継代細胞を培養し、単層となったところで不活化試験用培養液を除き、2本には試料25mLを、1本には陽性対照として10^{3.0} TCID₅₀/mLの猫カリシウイルス0.5mLをそれぞれ接種し、残りの1本には何も接種せずに36℃で1時間静置し、接種したものを除いた後それぞれ100mLの不活化試験用培養液を加えて36℃で7日間培養し、細胞を観察する。培養後、-70℃で60分間凍結した後、36℃で融解したものを細胞/培養液混合物とする。

3.3.2.2.2.2 第1回2次培養

別に、80cm²の細胞培養びん4本に猫腎継代細胞を培養し、単層となったところで不活化試験用培養液を除き、2本には原培養の細胞/培養液混合物10mLを、1本には陽性対照として10^{3.0} TCID₅₀/mLの猫カリシウイルス0.5mLをそれぞれ接種し、残りの1本には何も接種せずに36℃で1時間静置し、接種したものを除いた後、それぞれ50mLの不活化試験用培養液を加えて36℃で7日間培養し、細胞を観察する。培養後、-70℃で60分間凍結した後、36℃で融解したものを細胞/培養液混合物とする。

3.3.2.2.2.3 第2回2次培養

別に、80cm²の細胞培養びん4本に猫腎継代細胞を培養し、単層となったところで不活化試験用培養液を除き、2本には第1回2次培養の細胞/培養液混合物10mLを、1本には陽性対照として10^{3.0} TCID₅₀/mLの猫カリシウイルス0.5mLをそれぞれ接種し、残りの1本には何も接種せずに36℃で1時間静置し、接種したものを除いた後、それぞれ50mLの不活化試験用培養液を加えて36℃で7日間培養し、細胞を観察する。

3.3.2.2.3 判定

観察期間中、ウイルスのCPEを認めてはならない。ただし、陽性対照は、ウイルスのCPEを認めなければならない。

3.3.2.3 猫汎白血球減少症ウイルスの不活化試験

3.3.2.3.1 試験材料

3.3.2.3.1.1 試料

検体を試料とする

3.3.2.3.1.2 培養細胞

猫腎継代細胞を用いる。

3.3.2.3.2 試験方法

3.3.2.3.2.1 原培養

175cm²の細胞培養びん4本に猫腎継代細胞を培養し、単層となったところで不活化試験用培養液を除き、2本には試料25mLを、1本には陽性対照として10^{3.0} TCID₅₀/mLの猫汎白血球減少症ウイルス1.0mLをそれぞれ接種し、残りの1本には何も接種せずに36℃で1時間静置し、接種したものを除いた後、それぞれ100mLの不活化試験用培養液を加えて36℃で8日間培養し、細胞を観察する。

3.3.2.3.2.2 第1回2次培養

原培養の細胞を不活化試験用培養液に再浮遊し、カバーグラスの入った試験管に1mLずつ入れる。試験培養細胞から16本、陽性対照細胞から4本、陰性対照細胞から4本の試験管をそれぞれ調製し、36℃で8日間培養する。

3.3.2.3.2.3 蛍光染色

試験管からカバーグラスを取り、リン酸緩衝食塩液(pH 7.5)中で5回振りながら洗い流す。カ

カバーガラスの細胞を乾燥した後、2～8 のアセトンで 30 分間固定する。その後、カバーガラスにラベル血清 1 容及びマウス脳抽出物 6 容からなるマウス脳混合物 0.1mL を塗布し 36 で 30 分間反応させる。その後、リン酸緩衝食塩液 (pH 7.5) 中で 5 回振りながら洗い、更に注射用水中で 5 回振りながら洗う。カバーガラスの細胞を乾燥した後、グリセリンを塗布したスライドガラスにカバーガラスの細胞面を付ける。蛍光顕微鏡で細胞を観察する。

3.3.2.3.3 判定

観察期間中、原培養の細胞中にウイルスの CPE を認めてはならず、第 1 回 2 次培養で行った試験培養細胞及び陰性対照細胞の蛍光染色で特異蛍光を認めてはならない。ただし、陽性対照細胞の蛍光染色においては特異蛍光を認めなければならない。

3.3.3 ホルムアルデヒド定量試験

遊離ホルムアルデヒドの検出法 (付記 6) を準用して試験を行うとき、中和後のホルムアルデヒドの含有量は、0.25 mg/mL 以下でなければならない。

3.4 4 種混合原液の試験

3.4.1 無菌試験

3.1.3 を準用して試験するとき、適合しなければならない。

3.4.2 不活化試験

3.3.2 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 ホルムアルデヒド定量試験

3.3.3 を準用して試験するとき、ホルムアルデヒドの含有量は、0.25 mg/mL 以下でなければならない。

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。

3.5.2 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。

3.5.3 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 7.0 ~ 8.0 でなければならない。

3.5.4 ホルマリン定量試験

一般試験法のホルマリン定量試験法を準用して試験するとき、ホルマリンの含有量は、0.025 vol % 以下でなければならない。

3.5.5 アルミニウム定量試験

一般試験法のアルミニウム定量試験法を準用して試験するとき、アルミニウム含有量は、1 mL 中 2 mg 以下でなければならない。

3.5.6 不活化試験

3.5.6.1 試験材料

3.5.6.1.1 試料

試験品 2 mL 以上を 100 倍量以上のリン酸緩衝食塩液 (付記 7) を用い、4 で一夜透析して、不活化剤を除去したものを試料とする。

3.5.6.1.2 培養細胞

猫腎継代細胞を用いる。

3.5.6.2 試験方法

試料の全量及び細胞増殖用培養液 (付記 8) に浮遊させた猫腎継代細胞を同時に培養面積 25 cm² 以上の培養びんに接種し、37 で培養する。細胞が完全に単層を形成したとき、ウイルス増殖用培養液 (付記 9) と交換し、7 日間観察する。観察終了日に培養液を採取し、これに等量のホ

ウ酸緩衝食塩液（付記 10）を加える。さらに、この混合液と等量の VAD 6.0 液（付記 11）で調製した 0.5 vol % 豚赤血球浮遊液を加えて、赤血球凝集試験を行う。

3.5.6.3 判定

培養細胞に CPE を認めず、また、赤血球の凝集を認めない場合には、活性ウイルス陰性と判定する。

試料に活性ウイルスを認めてはならない。

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 か月齢未満の猫を用いる。

3.5.8.2 試験方法

試験動物 3 頭を試験群とし、2 頭を対照群とする。

試験群に注射材料を用法及び用量に従って注射し、対照群とともに 14 日間観察する。

3.5.8.3 判定

観察期間中、すべての試験動物に異常を認めてはならない。

3.5.9 力価試験

3.5.9.1 猫ウイルス性鼻気管炎力価試験

3.5.9.1.1 試験材料

3.5.9.1.1.1 注射材料

試験品を注射材料とする。

3.5.9.1.1.2 試験動物

体重約 100g のラットを用いる。

3.5.9.1.1.3 培養細胞

猫腎継代細胞を用いる。

3.5.9.1.1.4 中和試験用ウイルス

猫腎継代細胞で増殖させた猫ウイルス性鼻気管炎ウイルスを用いる。

3.5.9.1.1.5 参照陽性血清

抗猫ウイルス性鼻気管炎ウイルスラット血清（付記 12）を用いる。

3.5.9.1.2 試験方法

試験動物 5 匹を試験群とし、2 匹を対照群とする。

注射材料 1 mL ずつを試験群の筋肉内に注射し、3 週間後に試験群及び対照群から得られた各個体の血清について中和試験を行う。

非働化した被検血清及び参照陽性血清を細胞増殖用培養液で 2 倍階段希釈する。各希釈血清と 1 mL 中約 200TCID₅₀ を含む中和試験用ウイルス液とを等量混合し、4℃ で 24 時間処理する。各混合液 0.1mL ずつをそれぞれ培養細胞浮遊液を分注したプレートの 4 穴以上に接種し、37℃ で 7 日間培養し、観察する。

3.5.9.1.3 判定

CPE を阻止したものを中和抗体陽性として、中和抗体価を ED₅₀ で求める。

試験群の中和抗体価は、幾何平均値 8 倍以上でなければならない。この場合、対照群においては、4 倍未満でなければならない。また、参照陽性血清の中和抗体価は 8 ~ 32 倍でなければならない。

3.5.9.2 猫カリシウイルス力価試験

3.5.9.2.1 試験材料

3.5.9.2.1.1 注射材料

試験品を注射材料とする。

3.5.9.2.1.2 試験動物

3.5.9.1 の試験に用いた動物を用いる。

3.5.9.2.1.3 培養細胞

猫腎継代細胞を用いる。

3.5.9.2.1.4 中和試験用ウイルス

猫腎継代細胞で増殖させた猫カリシウイルスを用いる。

3.5.9.2.1.5 参照陽性血清

抗猫カリシウイルスラット血清（付記 13）を用いる。

3.5.9.2.2 試験方法

3.5.9.1 の試験において試験動物から得られた各個体の血清について中和試験を行う。

非働化した各血清及び参照陽性血清を細胞増殖用培養液で 2 倍階段希釈する。各希釈血清と 1 mL 中約 200 TCID₅₀ を含む中和試験用ウイルス液とを等量混合し、37 °C で 1 時間処理する。各混合液 0.1mL ずつをそれぞれ培養細胞浮遊液を分注したプレートの 4 穴以上に接種し、37 °C で 7 日間培養し、観察する。

3.5.9.2.3 判定

CPE を阻止したものを中和抗体陽性として、中和抗体価を ED₅₀ で求める。

試験群の中和抗体価は、幾何平均値 8 倍以上でなければならない。この場合、対照群においては、4 倍未満でなければならない。また、参照陽性血清の中和抗体価は、8 ~ 32 倍でなければならない。

3.5.9.3 猫汎白血球減少症ウイルス力価試験

3.5.9.3.1 試験材料

3.5.9.3.1.1 注射材料

試験品を注射材料とする

3.5.9.3.1.2 試験動物

3.5.9.1 の試験に用いた動物を用いる。

3.5.9.3.1.3 赤血球凝集抗原

猫汎白血球減少症ウイルス赤血球凝集抗原（付記 14）を用いる。

3.5.9.3.2 試験方法

3.5.9.1 の試験において試験動物から得られた各個体の血清を用いて赤血球凝集抑制反応を行う。

被検血清を 25 w/v % カオリン液及び豚赤血球で処理した後、ホウ酸緩衝食塩液で 2 倍階段希釈する。各希釈血清に 8 単位の赤血球凝集抗原を混合し、常温で 1 時間処理し、VAD 6.0 液で調整した 0.3 ~ 0.5vol % 豚赤血球浮遊液を加え、2 ~ 5 °C で一夜静置し、赤血球凝集の有無を観察する。

3.5.9.3.3 判定

赤血球凝集の抑制された血清の最高希釈倍率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 64 倍以上でなければならない。この場合、対照群においては、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、2 年 6 か月間とする。ただし、農林水産大臣が特に認めた場合には、その期間とする。

付記 1 ハートインフュージョン寒天培地

900 mL 中

ハートインフュージョン寒天培地	25 g
ハートインフュージョンブイヨン	10 g
プロテオーゼペプトン No. 3	10 g
1 w/v %酢酸タリウム	25 mL

水酸化ナトリウムで pH を 7.9 に調製する。

蒸留水 100 mL に酵母溶解物 5 g を溶かしてろ過滅菌したものを培地に加えた後、次に掲げるものを加える。

非働化馬血清	126 mL
DPN-システイン溶液* ¹	21 mL
ペニシリン	525,000 単位

*¹ ニコチンアミドアデニンジヌクレオチド（酸化型）1 g と塩酸 L-システイン 1 g をそれぞれ純水 100 mL に溶解する（1 w/v %溶液）。この 2 種類の溶液を混和し、ろ過滅菌後 - 20 に凍結保存する。

付記 2 ハートインフュージョンブイヨン

純水 970 mL に対してハートインフュージョンブイオンを 25 g とプロテオーゼペプトン No. 3 を 10 g、更に酵母溶解物 5 g 又は新鮮な酵母抽出物 5 mL を溶かした後、次に掲げる試薬を加える：

1 w/v %テトラゾリウムクロライド	5.5 mL
1 w/v %酢酸タリウム	25 mL
ペニシリン	500,000 単位
非働化馬血清	100 mL

水酸化ナトリウムで pH を 7.9 に調製し、ろ過滅菌する。

使用時に、ブイヨン 100 mL に対して DPN-システイン溶液（付記 3）2 mL を加える。

付記 3 ウイルス含有量試験用培養液

イーグル培地 1959	90 mL
牛胎子血清	5 mL
ラクトアルブミン水解物（5 w/v %液）	1 mL
炭酸水素ナトリウム（5 w/v %液）	3 mL
L-グルタミン（3 w/v %液）	1 mL

必要最少量の抗生物質を加えてもよい。

付記 4 赤血球浮遊液

猿の新鮮血をアルセバー溶液で 1 : 1 に希釈する。リン酸緩衝食塩液（pH 7.2）を加えて赤血球浮遊液を 2,000 rpm、10 分間で 3 回洗浄する。赤血球をリン酸緩衝食塩液（pH 6.0）に再浮遊し、1 % 子牛血清を加えて 0.5 vol % の浮遊液とする。4 で保存する。

付記 5 不活化試験用培養液

1,000mL 中	
イーグル培地 1959	944 mL
牛胎子血清	28 mL
炭酸水素ナトリウム（5 w/v %液）	28 mL

必要最少量の抗生物質を加えてもよい。

付記 6 遊離ホルムアルデヒドの検出法

酸性及び中性培地において、ホルムアルデヒドはフェニルヒドラジンと反応してフェニルヒドラゾンを生ずる。これは、更にヘキサシアノ鉄(Ⅱ)酸カリウムにより酸化されて赤色素を生ずる。その色調の強度は、ホルムアルデヒドの濃度に比例することから、エッペンドルフ光度計又はこれと同等のもので、492nm で測定する。

付記 7 リン酸緩衝食塩液

1,000mL 中

塩化ナトリウム 8.00 g

塩化カリウム 0.20 g

リン酸水素二ナトリウム十二水和物 1.15 g

リン酸二水素カリウム二水和物 0.20 g

水 残量

溶解して、pH を 7.0 ~ 7.4 に調整した後、121 °C で 15 分間高圧滅菌する。

付記 8 細胞増殖用培養液

1,000mL 中

5 %ラクトアルブミン水解物 10 mL

牛胎子血清 50 mL

イーグル MEM 残量

炭酸水素ナトリウムで pH を 6.8 ~ 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 ウイルス増殖用培養液

1,000mL 中

5 %ラクトアルブミン水解物 10 mL

イーグル MEM 残量

炭酸水素ナトリウムで pH を 6.8 ~ 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 10 ホウ酸緩衝食塩液

1,000mL 中

塩化ナトリウム 7.01g

ホウ酸 3.09g

水酸化ナトリウム 0.96g

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 11 VAD 6.0 液

1,000mL 中

塩化ナトリウム 8.77g

無水リン酸水素二ナトリウム 5.68g

リン酸二水素ナトリウム二水和物 40.56g

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 12 抗猫ウイルス性鼻気管炎ウイルスラット血清

猫ウイルス性鼻気管炎ウイルスで免疫したラット血清であって、中和抗体価 8 ~ 32 倍のもの

付記 13 抗猫カリシウイルスラット血清

猫カリシウイルスで免疫したラット血清であって、中和抗体価 8 ~ 32 倍のもの

付記 14 猫汎白血球減少症ウイルス赤血球凝集抗原

猫汎白血球減少症ウイルスを猫腎継代細胞で感染させて得た培養上清又はこれを不活化したものであって、赤血球凝集価 128 倍以上のもの