

犬パルボウイルス感染症生ワクチン

平成22年4月22日（告示第646号） 一部改正

1 定義

弱毒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調製した液状ワクチン又は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 名称

弱毒犬パルボウイルス NL-35-D 株又はこれと同等と認められた株

2.1.2 性状

犬に注射しても病原性を示さない。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。ただし、農林水産大臣が特に認めた場合には、その継代数以内とする。

原株及び原種ウイルスは、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。ただし、農林水産大臣が特に認めた場合には、その保存温度とする。

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 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 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。

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、そのろ液、遠心上清又はこれらを濃縮したものを混合し、原液とする。

原液について、3.2の試験を行う。

2.4 最終バルク

原液に適当と認められた安定剤を加えて混合し、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、乾燥製剤の場合は凍結乾燥して、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。

3.1.3 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 試験材料

3.2.2.1.1 試料

検体を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。

3.2.2.1.2 培養細胞

A72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。

3.2.2.1.3 培養液

適当と認められた培養液を用いる。

3.2.2.2 試験方法

試料の0.1mLずつを、4本(穴)以上の培養細胞浮遊液に加え、32℃又は37℃で1～3日間培養後、液交換を行い、さらに6～10日間培養する。

A72細胞については、CPEを観察する。猫腎継代細胞については、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1)を等量加える。更にこの混合液と等量のVAD6.0液(付記2)で調整した0.3～0.5vol%豚赤血球を用いて赤血球凝集試験を行う。ただし、農林水産大臣が特に認めた場合には、その試験方法とする。

3.2.2.3 判定

CPE又は赤血球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、1mL中10^{4.0}TCID₅₀以上でなければならない。ただし、農林水産大臣が特に認めた場合には、そのウイルス含有量とする。

3.3 小分製品の試験

次の試験を行う。ただし、液状製剤の場合には、3.3.2及び3.3.3の試験を行わない。

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、乾燥製剤にあつては、固有の色調を有する乾燥物でなければならない。液状製剤又は乾燥製剤を溶解したものは、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。

3.3.2 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、抗犬パルボウイルス血清（付記 3）を非働化したものを用いる。

また、液状製剤にあつては、必要と認められる場合、100 倍量以上のリン酸緩衝食塩液を用い、2～5℃で一夜透析したものを試料とする。

3.3.7 ウイルス含有量試験

3.3.7.1 試験材料

3.3.7.1.1 試料

試験品をウイルス増殖用培養液（付記 4）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。

3.3.7.1.2 培養細胞

猫腎継代細胞、NLDK-1 細胞又は適当と認められた培養細胞を用いる。

3.3.7.2 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、猫腎継代細胞では 32℃又は 37℃で、また、NLDK-1 細胞では 37℃でそれぞれ 24 時間静置培養した後、ウイルス増殖用培養液と交換し、更に 32℃又は 37℃で 6～10 日間培養する。培養後、培養液を採取し、これに等量のホウ酸緩衝食塩液を加え、更にこの混合液と等量の 0.5vol% 豚赤血球浮遊液を加え、2～5℃で静置した後、観察する。

3.3.7.3 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、猫腎継代細胞で 32℃で培養した場合は 1 頭分当たり 10^{5.5}TCID₅₀ 以上、猫腎継代細胞で 37℃で培養した場合は 1 頭分当たり 10^{5.5}TCID₅₀ 以上でなければならない、NLDK-1 細胞で培養した場合は 1 頭分当たり 10^{6.4}TCID₅₀ 以上でなければならない。ただし、農林水産大臣が特に認めた場合には、そのウイルス含有量とする。

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 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、農林水産大臣が特に認めた場合には、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異常を認めてはならない。

3.3.10 力価試験

3.3.10.1 試験材料

3.3.10.1.1 試験動物

3.3.9 の試験に用いた動物を用いる。

3.3.10.1.2 中和試験用ウイルス又は赤血球凝集抗原

中和試験用ウイルスとして犬パルボウイルス Y-1 株又は適当と認められた犬パルボウイルス株を用いる。

赤血球凝集抗原として犬パルボウイルス赤血球凝集抗原（付記5）を用いる。

3.3.10.1.3 培養細胞

猫腎継代細胞を用いる。

3.3.10.2 試験方法

中和試験又は赤血球凝集抑制試験のいずれかの試験を行う。

3.3.10.2.1 中和試験

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、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分間処理後、各混合液0.1mLずつを4本（穴）以上の培養細胞に接種し、35～37℃で24時間静置培養した後、培養液を交換し、更に35～37℃で6日間培養する。培養最終日に、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食塩液を加え、更にこの混合液と等量のVAD6.0液で調整した0.3～0.5vol%豚赤血球浮遊液を添加し、2～5℃で静置後、観察する。ただし、農林水産大臣が特に認めた場合には、その試験方法とする。

3.3.10.2.2 赤血球凝集抑制試験

3.3.9 の試験終了時に試験群及び対照群から得られた血清について赤血球凝集抑制試験を行う。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、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倍階段希釈する。それぞれ各希釈血清に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4℃で一夜処理し、赤血球凝集の有無を観察する。ただし、農林水産大臣が特に認めた場合には、その試験方法とする。

3.3.10.3 判定

3.3.10.3.1 中和試験

赤血球凝集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、200倍以上でなければならない。この場合、対照群は、4倍以下でなければならない。ただし、農林水産大臣が特に認めた場合には、その抗体価とする。

3.3.10.3.2 赤血球凝集抑制試験

赤血球の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、32倍以上でなければならない。この場合、対照群では8倍未満でなければならない。ただし、農林水産大臣が特に認めた場合には、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、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 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後、水酸化ナトリウム液で pH を 9.0 に調整する。

付記2 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 pH を 6.0 に調整する。

付記3 抗犬パルボウイルス血清

犬パルボウイルスで免疫した兔の血清で、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 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	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