

ジステンパー・犬アデノウイルス（2型）感染症・犬パルボウイルス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、弱毒犬アデノウイルス（2型）及び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レダリー株 VR128 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、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°C 以下又は凍結乾燥して 5°C 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 A₂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 を伴って増殖し、感染細胞に核内封入体を形成し、その培養ウイルス液はヒトの O 型赤血球を凝集す

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°C 以下又は凍結乾燥して 5°C 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 犬パルボウイルス株

2.1.3.1 名称

弱毒犬パルボウイルスコーネル株 CPV115 780916 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。ミンク及び猫腎継代細胞で増殖し、感染細胞に核内封入体を形成し、その培養ウイルス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°C 以下又は凍結乾燥して 5°C 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 製造用原料

2.2.1 ジステンパーウイルス

2.2.1.1 培養細胞

生ワクチン製造用材料の規格 2.1.1 の鶏胚初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 犬パルボウイルス

2.2.3.1 培養細胞

ミンク肺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、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、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 犬パルボウイルス原液

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、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）原液及び犬パルボウイルス原液を混合し、適当と認められた安定剤を加え、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、製造に継代細胞を用いている場合は、3.1.3 の試験は実施しなくてよい。

3.1.1 赤血球吸着試験

培養後 3 ～ 7 日目の細胞の表面を洗浄し、モルモット、鶏、豚及びヒト O 型赤血球の混合液を重層し、25 °C で 30 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。

3.1.2 赤血球凝集試験

培養後 3 ～ 7 日目の細胞を凍結融解し、その上清に等量の豚、鶏、モルモット及びヒト O 型赤血球浮遊液をそれぞれ加え、4 °C 及び 25 °C で 30 分間静置し、観察する。対照としてリン酸緩衝食塩液を用いて同様に操作する。このとき、赤血球凝集を認めてはならない。

3.1.3 封入体染色試験

培養細胞をギムザ染色し、観察するとき、異常な数の巨細胞、細胞変性効果又は細胞質も

しくは核内に封入体を認めてはならない。

3.1.4 マイコプラズマ否定試験

培養細胞を蒸留水で洗浄し、カルノア液で固定した後、リン酸緩衝食塩液で洗浄し、DAPI (4',6-diamidino-2-phenyl indole dihydrochloride) で染色し、リン酸緩衝食塩液で洗浄し、蛍光顕微鏡下でマイコプラズマの有無を観察するとき、培養細胞にマイコプラズマ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 0.25mL ずつをそれぞれ 4 本（穴）以上の培養細胞に接種し、37℃で 7 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 0.25mL ずつをそれぞれ 4 本（穴）以上の培養細胞に接種し、35 °C で 7 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、1mL 中 10^{5.0}TCID₅₀ 以上でなければならない。

3.2.2.3 犬パルボ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

犬腫瘍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

24 穴組織培養用プレートを用いる。試料 0.25mL ずつをそれぞれ 5 穴以上に分注し、各穴に細胞増殖用培養液で調整した培養細胞浮遊液を 1mL ずつ分注する。37 °C で 5 ～ 7 日間培養し、ペルオキシダーゼ標識抗パルボウイルスモノクローナル抗体を用いて酵素抗体法を行う。

3.2.2.3.3 判定

培養細胞に酵素抗体法による染色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^{6.0}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 及び 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）及び抗犬パルボウイルス血清（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 14 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(2型)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14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^{3.0}TCID₅₀以上でなければならない。

3.3.7.3 犬パルボ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

試験品中の犬パルボ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

猫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24時間静置培養した後、ウイルス増殖用培養液を交換し、更に37℃で6日間培養する。培養後、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緩衝食塩液(付記5)を加え、更にこの混合液と等量のVAD6.0液(付記6)で調製した0.5vol%豚赤血球浮遊液を加え、4℃で静置した後、観察する。

3.3.7.3.3 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、1頭分当たり10^{5.0}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。

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株を用いる。

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する。

各プール血清を非働化し、ウイルス増殖用培養液又は適当と認められた希釈液で 10 倍に希釈したのち、さらに 2 倍階段希釈し、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 °C で一夜処理する。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 °C で 7 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、10 倍以上でなければならない。この場合、対照群では、10 倍未満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する。

各プール血清を非働化し、ウイルス増殖用培養液又は適当と認められた希釈液で 10 倍に希釈したのち、さらに 2 倍階段希釈し、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 °C で 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 °C で 7 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 倍未満でなければならない。

3.3.10.3 犬パルボウイルス感染症力価試験

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 赤血球凝集抑制抗原

犬パルボウイルス赤血球凝集抗原（付記 7）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赤血球凝集抑制試験を行う。

各血清を非働化し、牛血清アルブミン加ホウ酸緩衝食塩液で希釈して、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。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、室温で 60 分間処理し、VAD6.0 液で調製した 0.5vol %豚赤血球浮遊液を加えて 4 °C で一夜静置し、赤血球凝集の有無を観察する。

3.3.10.3.3 判定

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、160 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。

4 貯法及び有効期間

有効期間は、2 年 3 か月間とする。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 20 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兎、モルモット又はフェレットの血清で、試験品中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）で免疫した兎又はモルモットの血清で、試験品中のウイルスを完全に中和する力価を有するもの

付記 4 抗犬パルボウイルス血清

犬パルボウイルスで免疫した兎又はモルモットの血清で、試験品中のウイルスを完全に中和する力価を有するもの

付記5 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	7.01 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、水酸化ナトリウムで pH を 9.0 に調整する。

付記6 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塩	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7 犬パルボウイルス赤血球凝集抗原

犬パルボウイルス Cp49 株を猫腎継代細胞で増殖させて得た培養上清を不活化させたもので、赤血球凝集価が 4,000 倍以上のもの