

猫白血病（アジュバント加）ワクチン（組換え型）

平成25年9月26日(告示第2480号)一部改正

1 定義

組換え DNA 技術を応用して製造された猫白血病ウイルスのエンベロープ糖蛋白 p45 を精製したものに、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 名称

猫白血病ウイルスサブグループ A エンベロープ抗原発現組換え大腸菌 MZ-1/pBO TF70D 株又はこれと同等と認められた株

2.1.2 性状

大腸菌に一致する生物学的性状を示し、かつ、塩酸テトラサイクリン加培地で発育する。発育には、ヒスチジン、イソロイシン及びバリンの各アミノ酸が必須である。

2.1.3 継代及び保存

原株及び種菌は、適当と認められた培地で継代する。

継代は、原株では2代以内、種菌では3代以内でなければならない。

原株及び種菌は、凍結して -70°C 以下で保存する。

2.2 製造用材料

2.2.1 培地

製造に適当と認められた培地を用いる。

2.3 原液

2.3.1 培養

種菌を培養したものを培養菌液とする。

2.3.2 原液の調整

培養種菌を遠心又はろ過し、菌体を回収して洗浄する。この菌体をホモジナイズした後に洗浄し、適当と認められた界面活性剤で処理し、封入体を回収する。これを適当と認められたタンパク変性剤によって可溶化し、ゲルろ過及びイオン交換カラムによって精製したものを原液とする。

原液について、3.1 の試験を行う。

2.4 最終バルク

原液にサポニン、水酸化アルミニウム及びチメロサルを添加し、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て小分製品とする。

小分製品について、3.2 の試験を行う。

3 試験法

3.1 原液の試験

3.1.1 同定試験

3.1.1.1 試験材料

尿素加トリス緩衝液 (pH8.0) で検体の蛋白量を 1 mL 当たり 1 mg に調整したものを、試料とする。

3.1.1.2 試験方法

試料を電気泳動し、クマシーブルー染色と抗猫白血病ウイルス p45 モノクローナル抗体 (付記 1) 及び抗大腸菌 MZ-1 株ポリクローナル抗体を用いたウエスタンブロットをそれぞれ行う。なお、対照として大腸菌 MZ-1 株を可溶化して用いる。

3.1.1.3 判定

クマシーブルー染色では、1本の主要な猫白血病毒 p45 抗原のバンドが観察されなければならない。ウエスタンブロットでは、モノクローナル抗体と反応する1本の主要なバンドが観察されなければならない。抗大腸菌 MZ-1 株ポリクローナル抗体とは反応してはならない。この場合において、対照では、抗大腸菌 MZ-1 株ポリクローナル抗体と反応して 20 ~ 76kDa の間に多くのバンドが認められなければならない。

3.2 小分製品の試験

3.2.1 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均質な液体でなければならない。異物及び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。

3.2.2 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、固有の値を示さなければならない。

3.2.3 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。

3.2.4 チメロサル定量試験

3.2.4.1 試験材料

3.2.4.1.1 試料

試験品を 450nm のメンブランフィルターでろ過したものを試料とする。

3.2.4.1.2 標準溶液

チメロサルを精製水で溶解し、チメロサル濃度 0 μ g/mL (精製水のみ)、60 μ g/mL 及び 120 μ g/mL となるように調整する。

3.2.4.1.3 カラム

オクタデシルシリル化シリカゲルを充填したカラム (内径 4.6mm \times 150mm) を用いる。

3.2.4.1.4 移動相

アセトニトリルと、リン酸で pH を 3.0 に調整した精製水を、75:25 の割合に混合したものを用いる。

3.2.4.2 試験方法

日本薬局方の高速液体クロマトグラフ法を準用して試験を行う。すなわち、標準溶液及び試料の 0.01mL ずつを室温でそれぞれカラムに注入し、波長 240nm での吸光度を測定する。得られた標準溶液のチメロサルのピーク面積から作成した検量線を用いて、試料のチメロサルのピーク面積から試料中のチメロサル量を算出する。

3.2.4.3 判定

試験品のチメロサル量は、1頭分当たり 0.11mg 以下でなければならない。

3.2.5 アルミニウム定量試験

一般試験法のアルミニウム定量法を準用して試験するとき、試験品のアルミニウム含有量は、1頭分当たり 1.8mg 以下でなければならない。

3.2.6 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。

3.2.7 同定試験

3.2.7.1 試験材料

3.2.7.1.1 試料

試験品 1本を 4 $^{\circ}$ C、1本を 20 ~ 35 $^{\circ}$ C でそれぞれ 1週間静置し、よく振とうした後、1 mL ずつをマイクロチューブにそれぞれ入れ、2,000 G で 5分間遠心して上清を除去する。沈渣に 100 μ L の 2倍濃度のサンプル用バッファーを加え、8分間煮沸したものを試料とする。

3.2.7.2 試験方法

試料 20 μ L 及び分子量マーカーをそれぞれ 12 %アクリルアミドゲル (7.5 \times 9.0cm) 上のウェルに充填し、泳動する。

試料のレーンのゲルを切り取り、一部はクマシーブルー染色を行い、一部は転写用膜に転写する。転写した膜を切り取り、一部クマシーブルー染色を行う。残りの膜に 1 w/v %牛血清アルブミン加リン酸緩衝食塩液を加え、37 $^{\circ}$ Cで1時間膜表面のブロッキングを行った後、リン酸緩衝食塩液を加えて3回洗浄する。この膜を牛血清アルブミン加リン酸緩衝食塩液で約 500 倍に希釈したモノクローナル抗体(付記1)と37 $^{\circ}$ Cで1時間反応させる。リン酸緩衝食塩液で3回洗浄し、更に500 ~ 2,000 倍に希釈したペルオキシダーゼ標識抗マウス IgG 抗体と 37 $^{\circ}$ Cで1時間反応させる。リン酸緩衝食塩液で3回洗浄し、基質液(付記2)に膜を入れ、発色のバンドが出現するまで室温で5 ~ 10 分間反応させる。膜を蒸留水で洗浄して反応を止め、風乾後、観察する。

3.2.7.3 判定

クマシーブルー染色で1本の主要なバンド(猫白血病ウイルス p45 抗原)と1本のマイナーなバンドが確認される。この主要なバンドとマイナーなバンドは、ウエスタンブロットによって確認されなければならない。クマシーブルー染色結果をデンスitometerで解析するとき、マイナーなバンドのピークの高さは、主要なバンドのピークの高さの40 %未満でなければならない。

3.2.8 蛋白定量試験

3.2.8.1 試験材料

試験品、参照水酸化アルミニウムゲル(付記3)及び参照牛血清アルブミン液(付記4。以下この項において「参照 BSA」という。)を使用する。

ただし、試験品及び参照水酸化アルミニウムゲルは、次の処理をする。

6本の試験品から900 μ Lずつ採取し、別々のマイクロチューブに入れる。別に参照水酸化アルミニウムゲルから900 μ Lずつ3本のマイクロチューブに入れる。これらを2,000G、5分間遠心した後、上清を除去してそれぞれの重量測定を行う。風袋重量を引いた試験品及び参照水酸化アルミニウムゲルのそれぞれの重量の平均値を算出し、これらの平均値の差が5 mg 以内であることを確認する。各マイクロチューブに0.1mol/L 水酸化ナトリウム液を450 μ L ずつ加え、混合した後、試験品及び参照水酸化アルミニウムゲルをそれぞれ混合し、試験品処理試料及び分光光度計ゼロ点調整用試料とする。

3.2.8.2 試験方法

試験品処理試料を50 μ L ずつ30本、参照 BSA の濃度0 μ g/mL のものを50 μ L ずつ2本及び参照 BSA の濃度150 ~ 250 μ g/mL のものを50 μ L ずつ各6本の試験管に入れる。全ての試験管に反応液(付記5)1 mL ずつを添加し、60 $^{\circ}$ Cで30分間反応させた後、4 $^{\circ}$ Cの水中で冷却する。2,000Gで10分間遠心し、その上清を分光光度計用セルにそれぞれ採取して、直ちに562nm の波長で吸光度を測定する。

3.2.8.3 判定

参照 BSA の各濃度における吸光度の平均値を計算し、単回帰分析を行い、Y を吸光度値、X を蛋白量とする $Y = aX + b$ の一次方程式を算出する。その相関係数は、0.99 以上でなければならない。試験品処理試料の平均吸光度値を Y として代入し、蛋白量 X を求めた後、1/2 を乗じたものを試験品の蛋白量とする。その蛋白量は、1 mL 当たり 102 μ g 以上でなければならない。

3.2.9 安全試験

3.2.9.1 試験材料

3.2.9.1.1 注射材料

試験品を注射材料とする。

3.2.9.1.2 試験動物

猫白血病ウイルス p45 抗原に対する抗体陰性の9 ~ 16週齢のSPF猫2頭を用いる。

3.2.9.2 試験方法

2頭の試験動物に注射材料2頭分ずつを皮下に注射し、21日間飼育し、観察する。

3.2.9.3 判定

試験観察中、試験群及び対照群に異常を認めてはならない。

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、農林水産大臣が特に認めた場合は、この限りでない。

付記1 モノクローナル抗体

猫白血病ウイルス p45 エンベロープ蛋白抗原に特異的に反応する抗体で、ハイブリドーマを接種して得たマウス腹水を精製して得たもの。

付記2 基質液

DAP (3,3'-Diaminobenzidine tetrahydrochloride) 15 mg と 30% 過酸化水素水 48 μ L をリン酸緩衝食塩液に加えて溶解し、全量 30mL になるように調製したもの。

付記3 水酸化アルミニウムゲル

動物医薬品検査所が適当と認めたもの。

付記4 参照牛血清アルブミン液

牛血清アルブミン（以下この項において「BSA」という。）を水で 1 mg/mL となるように作成した後、下表に準じて調整したものを各濃度の参照牛血清アルブミン液とする。

濃度	BSA	0.5mol/LNa OH	参照アルミニウムゲル	水
0	0	200	200	600
150	150	200	200	450
175	175	200	200	425
200	200	200	200	400
225	225	200	200	375
250	250	200	200	350

添加量はいずれも μ L
濃度は BSA 濃度 μ g/mL

付記5 反応液

動物医薬品検査所が指定したもの。