

猫免疫不全ウイルス感染症（アジュバント加）不活化ワクチン

平成 27 年 1 月 29 日（告示第 191 号）新規追加

1 定義

2 種類の猫免疫不全ウイルス持続感染細胞をそれぞれ増殖させて得たウイルス液を不活化した後混合し、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 1

2.1.1 名称

猫免疫不全ウイルスペタルマ株（以下この項において「ペタルマ株」という。）持続感染猫リンパ球継代細胞 FL6-SF 株又はこれと同等と認められた株

2.1.2 性状

製造用株 1 の全ての細胞に感染したペタルマ株は、レトロウイルス科オルソレトロウイルス属レンチウイルスの性状を示し、培養液中に浮遊して増殖した製造用株 1 で、CPE を伴わずに培養上清中に産生される。

2.1.3 継代及び保存

原株、原種細胞及び種細胞は、適当と認められた培養液で継代する。

原株の継代は、原種細胞の製造又は原株の恒久的な維持の目的以外で行ってはならない。

種細胞は、原種細胞からワクチンの製造ごとに用時調製する。種細胞は、原株から 24 代以内でなければならない。

原株及び原種細胞は、凍結して－70℃以下で保存する。

2.2 製造用株 2

2.2.1 名称

猫免疫不全ウイルス静岡株（以下この項において「静岡株」という。）持続感染猫リンパ球継代細胞 Shiz-SF 株又はこれと同等と認められた株

2.2.2 性状

製造用株 2 の全ての細胞に感染した静岡株は、レトロウイルス科オルソレトロウイルス属レンチウイルスの性状を示し、培養液中に浮遊して増殖した製造用株 2 で、CPE を伴わずに培養上清中に産生される。

2.2.3 継代及び保存

原株、原種細胞及び種細胞は、適当と認められた培養液で継代する。

原株の継代は、原種細胞の製造又は原株の恒久的な維持の目的以外で行ってはならない。

種細胞は、原種細胞からワクチンの製造ごとに用時調製する。種細胞は、原株から 24 代以内でなければならない。

原株及び原種細胞は、凍結して－70℃以下で保存する。

2.3 製造用材料

2.3.1 製造用感染細胞

凍結保存されている原種細胞を融解して用いる。

2.3.2 培養液

製造に適当と認められた培養液を用いる。

2.4 原液

2.4.1 製造用感染細胞の培養

原種細胞を複数回継代し、種細胞として必要な量まで増殖させたものを種細胞とする。

種細胞を培養液に接種し、適当と認められた時期に培養液を採取し、細胞浮遊液とする。1回に処理し、培養した細胞浮遊液を個別細胞浮遊液とみなす。培養開始前の培養細胞に異常を認めてはならない。

個別細胞浮遊液について、3.1の試験を行う。

2.4.2 不活化

個別細胞浮遊液にホルマリン又は適当と認められた不活化剤を加えて不活化する。次に、35w/v % 亜硫酸水素ナトリウム溶液又は適当と認められた液で中和し、これを不活化個別細胞浮遊液とする。

不活化個別細胞浮遊液について、3.2の試験を行う。

2.4.3 原液

不活化個別細胞浮遊液をろ過し、採取した細胞をリン酸緩衝食塩液1（付記1）で透析し、濃縮したものを原液とする。

原液について、3.3の試験を行う。

2.5 最終バルク

製造用株1及び2原液を混合し、適当と認められたアジュバントを添加し、最終バルクとする。この場合、適当と認められた保存剤を添加してもよい。

2.6 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、3.4の試験を行う。

3 試験法

3.1 培養細胞浮遊液の試験

個別培養細胞浮遊液の200 mL以上を対照培養細胞とし、これについて次の試験を行う。

3.1.1 培養観察

対照培養細胞を、顕微鏡で観察するとき、異常を認めてはならない。

3.1.2 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。

3.1.3 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。

3.2 不活化細胞浮遊液の試験

3.2.1 不活化試験

3.2.1.1 試験材料

3.2.1.1.1 試料

不活化個別細胞浮遊液1 mLに亜硫酸水素ナトリウムを加えてホルマリンを中和し、更に2～7℃で4～24時間透析したものを試料とする。

3.2.1.1.2 培養細胞

浮遊状態で増殖するインターロイキン-2依存性リンパ球継代細胞TEC-1細胞を用いる。TEC-1細胞は、1～4日間隔で、1:2～1:10に継代培養する。培養開始時の細胞濃度は、 $1.5 \sim 3.0 \times 10^5$ 細胞/mLとする。

3.2.1.2 試験方法

試料全量を9 mLの培養細胞を含む培養フラスコに接種する。別に9 mLの培養細胞を含む培養フラスコを2本用意し、このうち1本には $10^2 \sim 10^3$ TCID₅₀の猫免疫不全ウイルスを含むウイルス液1 mLを接種して、陽性対照とする。もう1本には何も接種せず、陰性対照とする。それぞれを34～38℃、5 vol %炭酸ガス下で培養する。3～4日目及び7日目に培養液を回収し、遠心して上清を捨てた後、新しい不活化試験用培養液1（付記2）10mLを加えて交換する。13～15日間培養後、培養液1 mL

を培養 1～4 日目の培養細胞に接種、継代し、再度同条件で 13～15 日間培養する。それぞれの培養フラスコから培養液を回収し、遠心した上清を猫免疫不全ウイルスの構造蛋白質 p24 抗原を検出する酵素結合免疫吸着法又はこれと同等の方法で試験する。

3.2.1.3 判定

ウイルスが検出されない場合、活性ウイルス陰性と判定する。ただし、陽性対照にはウイルスが検出され、陰性対照にはウイルスが検出されてはならない。

3.3 原液の試験

3.3.1 ウイルス含有量試験

3.3.1.1 製造用株 1

3.3.1.1.1 試験材料

3.3.1.1.1.1 試料

検体を、検体処理液（付記 3）で 9 倍に希釈し、超音波処理したものを試料とする。参照標準ワクチン（付記 4）及び陰性対照（付記 5）も同様に処理する。

3.3.1.1.1.2 抗体

抗猫免疫不全ウイルス外被膜蛋白質マウスモノクローナル抗体（付記 6）及びペルオキシダーゼ標識抗マウス IgG 抗体（付記 7）を用いる。

3.3.1.1.1.3 固相化プレート

抗原捕捉用レクチン（付記 8）を吸着用緩衝液（付記 9）で 500 倍に希釈したものを 100 μ L ずつ 96 穴 ELISA プレートに分注し、4℃で 12 時間以上反応させる。リン酸緩衝食塩液 2（付記 10）で 4 回洗浄後、ブロッキング液（付記 11）を 200 μ L ずつ加え、37℃で 60 分～75 分間反応させる。反応後、リン酸緩衝食塩液 2 で 4 回洗浄する。

3.3.1.1.2 試験方法

別に用意した希釈用 96 穴プレートを用いて、試料及び参照標準ワクチンを試料希釈液（付記 12）で 1.75 倍階段希釈する。各希釈検体及び希釈参照標準ワクチン 100 μ L を固相化プレートに移して、37℃で 120 分間反応させる。反応後、各穴を洗浄液（付記 13）で 4 回洗浄する。

抗体希釈用緩衝液（付記 14）で 4,000 倍に希釈した抗猫免疫不全ウイルス外被膜蛋白質マウスモノクローナル抗体を各穴に 100 μ L ずつ加えて、37℃で 60 分間反応させる。反応後、各穴を洗浄液で 4 回洗浄する。

抗体希釈用緩衝液で希釈したペルオキシダーゼ標識抗マウス IgG 抗体を各穴に 100 μ L ずつ加えて、37℃で 60 分間反応させる。反応後、各穴を洗浄液で 4 回洗浄する。

基質液（付記 15）を 100 μ L ずつ各穴に加えて、37℃で 15 分間反応させる。反応後、各穴の吸光度を主波長 650 nm、補正波長 490 nm の 2 波長で測定する。陰性対照をブランクとする。

3.3.1.1.3 判定

相対力価の統計学的計算法（付記 16）により参照標準ワクチンに対する相対力価を算出する。相対力価は、2.5 以上でなければならない。

3.3.1.2 製造用株 2

3.3.1.1 を準用して試験を行うとき、相対力価は、1.0 以上でなければならない。

3.3.2 同定試験

3.3.2.1 製造用株 1

3.3.2.1.1 試験材料

3.3.2.1.1.1 試料

検体を用いる。

3.3.2.1.2 試験方法

試料 50 μ L に PBST 緩衝液（付記 17）を 0.950 mL 加え、ゆるやかに攪拌する。遠心及び PBST 緩衝液による洗浄作業を 2 回以上繰り返した後、上清を捨て、沈渣をタンパク質分解酵素（付記 18）7

μ L に PCR 溶解液（付記 19）を 1 mL 加えた液に再浮遊させる。65 ± 2 °C で 1 時間反応させ、攪拌、遠心を繰り返し、上清を回収する。95 ~ 100 °C で 10 ~ 15 分間反応させ、冷却後、遠心して上清を回収する。上清について猫免疫不全ウイルス同定用プライマー（付記 20）を用いて DNA の増幅反応を行い、PCR 産物を電気泳動して観察する。

3.3.2.1.3 判定

電気泳動像にペタルマ株特定の分子量（408bp）のバンドを認めた場合、ペタルマ株陽性と判定する。また、静岡株特定の分子量（235bp）にバンドを認めた場合、静岡株陽性とする。

試料は、ペタルマ株陽性かつ静岡株陰性でなければならない。

3.3.2.2 製造用株 2

3.3.2.1 を準用して試験を行うとき、静岡株陽性かつペタルマ株陰性でなければならない。

3.4 小分製品の試験

3.4.1 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、静置の状態では沈殿を認めるが、振とうすれば乳白色の均質な懸濁液であり、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。

3.4.2 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。

3.4.3 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。

3.4.4 不活化試験

3.4.4.1 試験材料

3.4.4.1.1 試料

試験品の 5 mL を 100 倍量以上のリン酸緩衝食塩液を用いて、4 °C で一夜透析し、不活化剤を除去したものを試料とする。

3.4.4.1.2 培養細胞

CRFK 細胞を用いる。

3.4.4.2 試験方法

不活化試験用培養液 2（付記 21）に浮遊した培養細胞を、6 穴プレートの全穴に加えて、37 °C に 3 時間静置する。試料 2 mL に不活化試験用培養液 2 を 10 mL 加えて混合し、単層を形成した培養細胞 1 穴に対して 2 mL ずつ接種する。6 穴プレートを 400 G で 2 時間、常温で遠心する。試料を除き、細胞表面を不活化試験用培養液 2 で洗浄した後、不活化試験用培養液 2 を加えて 37 °C で 7 日間培養する。培養後 1 日目と 4 日目に、新しい培養液と交換する。培養最終日に全ての穴から培養液を採取し、2,000 G で 15 分間遠心して上清を回収する。回収した培養上清から RNA を抽出し、cDNA 合成プライマー（付記 22）及び逆転写酵素を用いて cDNA を合成する。cDNA を鋳型としてファースト PCR 用プライマー（付記 23）及びネステッド PCR 用プライマー（付記 24）を用いてネステッド PCR を行い、PCR 産物を電気泳動して観察する。

3.4.4.3 判定

電気泳動像に猫免疫不全ウイルス RNA 由来の遺伝子増幅産物（分子量 323bp）のバンドを認めない場合、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。

3.4.5 ホルマリン定量試験

試験品を遠心処理して得たものを試料とし、一般試験法のホルマリン定量法を準用して試験するとき、ホルマリンの含有量は、0.1 vol % 以下でなければならない。

3.4.6 毒性限度確認試験

一般試験法の毒性限度確認試験法 1 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、体重測定は、2日目に行うものとする。

3.4.7 安全試験

3.4.7.1 試験材料

3.4.7.1.1 注射材料

試験品を注射材料とする。

3.4.7.1.2 試験動物

2～6か月齢の猫を用いる。

3.4.7.2 試験方法

試験動物3頭を試験群、2頭を対照群とする。

試験群に注射材料を3 mLずつ皮下注射し、対照群と共に14日間観察する。

3.4.7.3 判定

観察期間中、一過性の反応（注射局所の浮腫や腫脹、発熱、体重減少等）や硬結を除き、臨床的な異常を認めてはならない。

3.4.8 力価試験

3.3.1.1を準用して試験するとき、相対力価は、1.25以上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 リン酸緩衝食塩液1

1,000 mL 中

塩化ナトリウム 2.00 g

リン酸水素二ナトリウム（無水） 1.20 g

リン酸二水素カリウム（無水） 0.20 g

フェノールレッド 0.02 g

水 残量

pHを7.2に調整する。

付記2 不活化試験用培養液1

PRMI-1640に以下の成分を加えたもの。

10 vol % 牛胎子血清

2 mmol/L L-グルタミン

25 mmol/L ヘペス

1,000U/mL 組換えヒト型インターロイキン-2

25 μ mol/L 2-メルカプトエタノール

2 μ g/mL ポリブレン

50 μ g/mL ゲンタマイシン

付記3 検体処理液

リン酸緩衝食塩液2（付記10）23.67 mLと界面活性剤エンピゲンBB液又はこれと同等のもの3.00 mLを混和したもの。

付記4 参照標準ワクチン

猫免疫不全ウイルス感染症参照標準ワクチンとして動物医薬品検査所が適当と認めたもの。

付記5 陰性対照

リン酸緩衝食塩液にワクチンの製造方法と同様にアジュバントを添加したもの。

- 付記 6 抗猫免疫不全ウイルス外被膜蛋白質マウスモノクローナル抗体
猫免疫不全ウイルスの外被膜蛋白質に特異的なモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマ細胞 Clone1D9 の培養上清。
- 付記 7 ペルオキシダーゼ標識抗マウス IgG 抗体
ペルオキシダーゼ標識抗マウス IgG 山羊血清
- 付記 8 抗原捕捉用レクチン
1 mL 中
ガラナサス・ニバリス凝集素 5 g
水 残 量
溶解後 30 分間混和する。
- 付記 9 吸着用緩衝液
1,000 mL 中
炭酸ナトリウム 1.59 g
炭酸水素ナトリウム 2.93 g
水 残 量
pH を 9.7 ± 0.1 に調整する。
- 付記 10 リン酸緩衝食塩液 2
1,000 mL 中
リン酸二水素ナトリウム (無水) 0.253 g
リン酸水素二ナトリウム (無水) 1.190 g
塩化ナトリウム 8.500 g
水 残 量
pH を 7.2 ± 0.1 に調整する。
- 付記 11 ブロッキング液
吸着用緩衝液 100 mL に脱脂粉乳約 1 g を溶解したもの。
- 付記 12 試料希釈液
リン酸緩衝食塩液 2 90 mL に界面活性剤エンピゲン BB 液又はこれと同等のものを 10 mL 加え混和したもの。
- 付記 13 洗浄液
リン酸緩衝食塩液 2 1,000 mL
ポリソルベート 20 3 mL
- 付記 14 抗体希釈用緩衝液
脱脂粉乳 1 g
洗浄液 100 mL

付記 15	基質液	
	0.04 w/v %テトラメチルベンチジン液	10 mL
	0.02 vol %過酸化水素水	10 mL
付記 16	相対力価の統計学的計算法 動物医薬品検査所が適当と認めたもの。	
付記 17	PBST 緩衝液	
	塩化ナトリウム	85 g
	リン酸水素二ナトリウム	5.65 g
	リン酸二水素カリウム	1.35 g
	水	9.7 L
	ポリソルベート 20	30 mL
付記 18	タンパク質分解酵素 プロテイナーゼ K 又は同等のもの。	
付記 19	PCR 溶解液	
	1,000 mL 中	
	1mol/L トリス塩酸緩衝液	10 mL
	1mol/L 塩化カリウム	20 mL
	1mol/L 塩化マグネシウム	0.1 mL
付記 20	猫免疫不全ウイルス同定用プライマー	
	ペタルマ株用	
	以下の塩基配列のもの。	
	5'-CAA TAC CAC CAA GTT CTG GCA AC-3'	1 μ L
	5'-CCA TCC TAC CCA ATC TTC CCA -3'	1 μ L
	静岡株用	
	以下の塩基配列のもの。	
	5'- CAA TCC AAT AGC GGG GTT AAG AC -3	1 μ L
	5'- TGC TTT TTG ATG GGT AGC CAA C -3'	1 μ L
付記 21	不活化試験用培養液 2	
	1,000 mL 中	
	5 w/v%ラクトアルブミン水解物液	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 7.2 ~ 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 22	cDNA 合成プライマー	
	以下の塩基配列で、50 μ M 濃度のもの。	
	VGR8-OR : 5'-TGCTCTTGATCTATTTGAGCA-3'	

付記 23 ファースト PCR 用プライマー

以下の塩基配列で、10 μ M 濃度のもの。

VGR1-OF-50 : 5'-TAAATATGACTGTATCTACTGC-3'

VGR8-OR : 5'-TGCTCTTGATCTATTTGAGCA-3'

付記 24 ネステッド PCR 用プライマー

以下の塩基配列で、10 μ M 濃度のもの。

VGR2-IF : 5'-TATTCAAACAGTAAATGGAG-3'

VGR7-IR : 5'-GTTGTTCTTGAGTTAATCCT-3'