

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・猫白血病（組換え型）混合（油性アジュバント加）不活化ワクチン

平成 21 年 3 月 26 日（告示第 420 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それぞれ培養細胞で増殖させて得たウイルス液を不活化したもの及び組換え 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 70（以下「gp70」という。）を精製したものを混合し、油性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 FR-1 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。

継代は原株では 3 代以内、種ウイルスでは 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 FC-7 株又はこれ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。

継代は原株では 3 代以内、種ウイルスでは 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 FP-5 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。

継代は原株では 3 代以内、種ウイルスでは 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。

2.1.4 猫白血病ウイルス gp70 組換え大腸菌株

2.1.4.1 名称

猫白血病ウイルス gp70 組換え大腸菌 pEL 株又はこれと同等と認められた株

2.1.4.2 性状

アンピシリン耐性で、対数増殖期の後期に発現誘導剤を添加すると、猫白血病ウイルス gp70 遺伝子が発現し、組換え蛋白を産生する。

2.1.4.3 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し、種菌は原株より作製する。

継代は原株では3代以内、種菌では2代以内でなければならない。

原株及び種菌は、グリセリンを添加し、凍結して-70℃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適当と認められた培養細胞を用いる。

2.2.2.2 培養液

製造に適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適当と認められた培養細胞を用いる。

2.2.3.2 培養液

製造に適当と認められた培養液を用いる。

2.2.4 猫白血病ウイルス gp70 組換え大腸菌

2.2.4.1 培地

製造に適当と認められた寒天培地及び液体培地を用いる。

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、培養後、ウイルスの増殖極期に感染細胞相を採取し、その遠心沈渣をウイルス感染細胞とする。

ウイルス感染細胞を採取した上清について、3.2.1及び3.2.2.1の試験を行う。

2.3.1.3 不活化

ウイルス感染細胞相を適当と認められた界面活性剤で可溶化し、遠心した上清にホルマリンを加えてウイルスを不活化したものを原液とする。

原液について、3.5.1、3.5.2.1及び3.5.3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

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の遠心上清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 の試験を行う。

2.3.2.3 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し、不活化ウイルス液とする。不活化ウイルス液を濃縮し、原液とする。

原液について、3.5.1 及び 3.5.2.2 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、培養した細胞を個体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なければならない。

個体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の遠心上清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し、適当と認められた方法で濃縮したものを原液とする。

原液について、3.5.1 及び 3.5.2.3 の試験を行う。

2.3.4 組換え大腸菌発現猫白血病ウイルス gp70

2.3.4.1 元培養

種菌を寒天培地で培養し、液体培地に移植後培養したものを元培養菌液とする。

元培養菌液について、3.3 の試験を行う。

2.3.4.2 本培養

元培養菌液を新たな液体培地に加え、適当と認められた発現誘導剤を添加し、培養したものを本培養菌液とする。

本培養菌液について、3.3 の試験を行う。

2.3.4.3 不活化

本培養菌液の沈渣を適当と認められた溶液に浮遊し、感作後、超音波処理したものを不活化菌液とする。

不活化菌液について、3.4 の試験を行う。

2.3.4.4 精製

不活化菌液を遠心し、沈渣を適当と認められた界面活性剤で可溶化し、その遠心上清を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、3.5.1 及び 3.5.4 の試験を行う。

2.3.5 原液の混合

猫ウイルス性鼻気管炎ウイルス原液、猫カリシウイルス原液、猫汎白血球減少症ウイルス原液及び組換え大腸菌発現猫白血病ウイルス gp70 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、3.6 の試験を行う。

2.4 最終バルク

4 種混合原液を混合し、濃度調整し、適当と認められた油性アジュバントを加えて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、3.7 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、これについて次の試験を行う。

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、37℃で7日間培養して観察するとき、CPEを認めてはならない。

3.1.2 赤血球吸着試験

3.1.1 の試験最終日に培養びんの培養液を除き、リン酸緩衝食塩液で細胞表面を2回洗浄し、0.1vol%モルモット赤血球浮遊液を重層し、60分間静置し、観察するとき、培養細胞に赤血球の吸着を認めてはならない。

3.2 ウイルス感染細胞上清又はウイルス浮遊液の試験

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 猫ウイルス性鼻気管炎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）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

猫腎継代細胞を用いる。

3.2.2.1.2 試験方法

試料の0.1 mLずつをそれぞれ4本以上の培養細胞に接種し、37℃で60分間吸着させた後、ウイルス増殖用培養液を加え、37℃で7日間回転培養し、観察する。

3.2.2.1.3 判定

培養細胞にCPEが認められ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^{7.0}TCID₅₀以上でなければならない。

3.2.2.2 猫カリシ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。

3.2.2.2.1.2 培養細胞

猫腎継代細胞を用いる。

3.2.2.2.2 試験方法

試料の0.1mLずつをそれぞれ4本以上の培養細胞に接種し、37℃で60分間吸着させた後、ウイルス増殖用培養液を加え、37℃で7日間回転培養し、観察する。

3.2.2.2.3 判定

培養細胞にCPEが認められ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^{8.0}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

猫腎継代細胞浮遊液を小試験管に 0.5mL ずつ分注し、37 °C で約 24 時間培養し、細胞層を約 50 % 形成させたものを用いる。

3.2.2.3.2 試験方法

試料の 0.1mL ずつをそれぞれ 4 本以上の培養細胞に接種し、37 °C で 60 分間吸着後、細胞増殖用培養液を加え、37 °C で静置培養する。

培養細胞が完全に単層を形成した後、1 mL のウイルス増殖用培養液と交換し、37 °C で接種後 10 日間回転培養した後、1 vol % 豚赤血球浮遊液を 0.2 mL 加え、2 ~ 5 °C で一夜静置し、観察する。

3.2.2.3.3 判定

赤血球の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、1 mL 中 10^{6.25}TCID₅₀ 以上でなければならない。

3.3 培養菌液の試験

3.3.1 夾雑菌否定試験

3.3.1.1 試験材料

検体及び BCP 乳糖寒天培地（付記 2）を用いる。

3.3.1.2 試験方法

検体 1 白金耳を BCP 乳糖寒天培地 5 枚に連続して塗抹し、37 °C で 24 時間培養する。

3.3.1.3 判定

いずれの培地上にも黄色以外の集落を認めてはならない。

3.4 不活化菌液の試験

3.4.1 不活化試験

3.4.1.1 試験材料

検体及び液体チオグリコール酸培地（付記 3）を用いる。

3.4.1.2 試験方法

培地を 20mL 宛ずつ分注した試験管 2 本に 1 mL、他の 2 本に 0.5mL ずつ接種し、37 °C で 48 時間培養した後、新しい培地に 1 mL を継代し、37 °C で 48 時間培養する。

3.4.1.3 判定

いずれの試験管にも菌の発育による混濁を認めてはならない。

3.5 原液の試験

3.5.1 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。

3.5.2 不活化試験

3.5.2.1 猫ウイルス性鼻気管炎ウイルス不活化試験

3.5.2.1.1 試験材料

3.5.2.1.1.1 試料

適当と認められた方法で検体から界面活性剤を除去したものを試料とする。

3.5.2.1.1.2 培養細胞

猫腎継代細胞を用いる。

3.5.2.1.2 試験方法

試料を 25cm² 以上の培養細胞に接種し、37 °C で 60 分間吸着させた後、ウイルス増殖用培養液を用いて細胞を 2 回洗浄後、ウイルス増殖用培養液を加え、37 °C で 10 日間培養し、観察する。

3.5.2.1.3 判定

培養細胞に CPE を認めないとき、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。

3.5.2.2 猫カリシウイルス不活化試験

3.5.2.2.1 試験材料

3.5.2.2.1.1 試料

検体 2 mL 以上を 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、不活化剤を除去したものを試料とする。

3.5.2.2.1.2 培養細胞

猫腎継代細胞を用いる。

3.5.2.2.2 試験方法

試料を 25cm² 以上の培養細胞に接種し、37℃で 60 分間吸着させた後、ウイルス増殖用培養液を用いて細胞を 2 回洗浄後、ウイルス増殖用培養液を加え、37℃で 10 日間培養し、観察する。

3.5.2.2.3 判定

培養細胞に CPE を認めないとき、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。

3.5.2.3 猫汎白血球減少症ウイルス不活化試験

3.5.2.3.1 試験材料

3.5.2.3.1.1 試料

検体 2 mL 以上を 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、不活化剤を除去したものを試料とする。

3.5.2.3.1.2 培養細胞

猫腎継代細胞を細胞増殖用培養液（付記 4）で、 3×10^5 個/mL に浮遊させたものを用いる。

3.5.2.3.2 試験方法

試料の全量及び細胞増殖用培養液に浮遊させた猫腎継代細胞を同時に培養面積 25cm² 以上の培養びんで 37℃で培養する。細胞が単層を形成した後、ウイルス増殖用培養液で液交換し、さらに 10 日間観察する。観察最終日に培養びんの培養液を採取し、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）を加える。さらに、この混合液と等量の VAD6.0 液（付記 6）で調整した 0.5vol % 豚赤血球浮遊液を加え、赤血球の凝集の有無を観察する。

3.5.2.3.3 判定

培養細胞に CPE、培養液に赤血球の凝集を認めないとき、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。

3.5.3 赤血球凝集価測定試験

3.5.3.1 試料

適当と認められた方法で検体から界面活性剤を除去したものを 0.1w/v % 牛血清アルブミン加リン酸緩衝食塩液を用いて 2 倍階段希釈し、各段階の希釈液を試料とする。

3.5.3.2 試験方法

試料 50 μ L に 0.1w/v % 牛血清アルブミン加リン酸緩衝食塩液で調整した 1 vol % 猫赤血球浮遊液をそれぞれ 50 μ L ずつ加え、37℃で 2 時間静置し、観察する。

3.5.3.3 判定

赤血球の凝集を認めた試料の最高希釈倍数で赤血球凝集価を表す。

検体の赤血球凝集価は、64 倍以上でなければならない。

3.5.4 抗原量の測定

3.5.4.1 試験材料

検体、透析用液及び参照牛血清アルブミン液（参照 BSA）（付記 7）を用いる。

3.5.4.2 試験方法

透析用液で 5 倍に希釈した検体と各濃度の参照 BSA を 100 μ L ずつ試験管に入れる。すべての試験管に反応液 A（付記 8）を 1,000 μ L ずつ入れ混和し、常温で 20 分間感作した後、反応液 B（付記 9）を 100 μ L ずつ入れ、30 分～2 時間感作したのものについて、550nm の波長で吸光度を測定する。

3.5.4.3 判定

単回帰分析を行い、Yを吸光度値、Xを蛋白量とする $Y = aX + b$ の一次方程式で算出する。相関係数は0.99以上でなければならない。検体の吸光度値をYとして代入し、蛋白量Xを求め、検体の蛋白量とする。

蛋白量は、0.5mg/mL以上でなければならない。

3.6 4種混合原液の試験

3.6.1 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。

3.6.2 ホルマリン定量試験

適当と認められた方法で検体を処理したものを試料とし、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、測定値を製品中における含有量に補正するとき0.1vol %以下でなければならない。ただし、小分製品についてホルマリン定量試験を実施する場合には、実施しなくてもよい。

3.7 小分製品の試験

3.7.1 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、固有の色調及び粘稠性をもつ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。

3.7.2 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。

3.7.3 ホルマリン定量試験

試験品又は、適当と認められた方法で試験品を処理したものを試料とし、一般試験法のホルマリン定量試験を準用して試験するとき、ホルマリンの含有量は、測定値を製品中における含有量に補正するとき0.1vol %以下でなければならない。

3.7.4 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。

ただし、モルモット1群2頭とも7日目の体重が注射時の体重を下回らない限り適合と判定する。

3.7.5 安全試験

3.7.5.1 試験材料

3.7.5.1.1 注射材料

試験品を注射材料とする。

3.7.5.1.2 試験動物

体重約1 kgの猫を用いる。

3.7.5.2 試験方法

試験動物4頭を試験群、2頭を対照群とする。注射材料を試験群の2頭には5 mLずつを頸背部皮下に、2頭には2 mLずつを内股部筋肉内に注射し、注射後5日間体温を測定し、10日目まで観察する。

3.7.5.3 判定

観察期間中、対照群においては異常を認めてはならず、試験群においては一過性の発熱を認めることがあっても2日以内に正常に復し、その他の異常を認めてはならない。

3.7.6 力価試験

3.7.6.1 猫ウイルス性鼻気管炎力価試験

3.7.6.1.1 試験材料

3.7.6.1.1.1 注射材料

試験品を注射材料とする。

3.7.6.1.1.2 試験動物

体重約100 gのラットを用いる。

3.7.6.1.1.3 培養細胞

猫腎継代細胞を用いる。

3.7.6.1.1.4 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。

3.7.6.1.2 試験方法

試験動物 5 匹を試験群、2 匹を対照群とする。注射材料 1 mL ずつを試験群の臀部筋肉内に 3 週間隔で 2 回注射する。第 2 回注射後 7 日目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。

血清を非働化し、中和試験用希釈液（付記 10）で 4 倍階段希釈する。各希釈血清と 0.2mL 中に約 100PFU を含む中和試験用ウイルス液とを等量混合し、37 °C で 60 分間処理する。別に中和試験用ウイルス液と中和試験用希釈液とを等量混合し、希釈血清と同様に処理したものをウイルス対照とする。各混合液 0.2mL ずつを 2 枚の培養細胞に接種し、37 °C で 60 分間吸着させた後、混合液を除き、第 1 次重層寒天培地（付記 11）を重層し、37 °C 5 vol % 炭酸ガス下で 3 - 4 日間培養する。培養後、さらに第 2 次重層寒天培地（付記 12）を重層し、37 °C で 24 時間培養し、観察する。

3.7.6.1.3 判定

被検血清のブラック数の平均値がウイルス対照のブラック数の平均値の 50 % 以下に減少した血清の最高希釈倍数で中和抗体価を表す。

試験群の中和抗体価は、幾何平均値で 16 倍以上でなければならない。この場合、対照群では、4 倍未満でなければならない。

3.7.6.2 猫カリシウイルス感染症力価試験

3.7.6.2.1 試験材料

3.7.6.2.1.1 試験動物

3.7.6.1 の試験に用いた動物を用いる。

3.7.6.2.1.2 培養細胞

猫腎継代細胞を用いる。

3.7.6.2.1.3 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。

3.7.6.2.2 試験方法

3.7.6.1 で得られた各個体の血清について中和試験を行う。

各個体の血清を非働化し、中和試験用希釈液で 2 倍階段希釈する。各希釈血清と 0.1mL 中約 200TCID₅₀ を含む中和試験用ウイルス液とを等量混合し、37 °C で 60 分間処理する。各混合液 0.1mL ずつをそれぞれ 4 本の培養細胞に接種し、37 °C で 60 分間吸着させた後、混合液を除き、ウイルス増殖用培養液を加え、37 °C で 7 日間回転培養し、観察する。

3.7.6.2.3 判定

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、幾何平均値で 16 倍以上でなければならない。この場合、対照群では、2 倍未満でなければならない。

3.7.6.3 猫汎白血球減少症力価試験

3.7.6.3.1 試験材料

3.7.6.3.1.1 注射材料

試験品を注射材料とする。

3.7.6.3.1.2 試験動物

体重約 100g のラットを用いる。

3.7.6.3.1.3 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 13）を用いる。

3.7.6.3.2 試験方法

試験動物 5 匹を試験群、2 匹を対照群とする。注射材料の 1 mL ずつを試験群の臀部筋肉内に注射し、3 週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赤血球凝集抑制試験を行う。

被験血清を 25w/v %カオリン液及び豚赤血球で処理した後、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 単位の猫汎白血球減少症ウイルス赤血球凝集抗原を加え、常温で 60 分間処理し、VAD6.0 液で調整した 0.5vol %豚赤血球浮遊液を加え、2～5℃で一夜静置し、赤血球凝集の有無を観察する。

3.7.6.3.3 判定

赤血球の凝集の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、幾何平均値で 128 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。

3.7.6.4 猫白血病力価試験

3.7.6.4.1 試験材料

3.7.6.4.1.1 試験動物

3.7.6.1 の試験に用いた動物を用いる。

3.7.6.4.1.2 抗原固相化プレート

gp70 精製抗原（付記 14）を炭酸緩衝液（付記 15）で希釈し、96 穴プレートの各穴に 0.05mL ずつ加え、37℃で 60 分間反応させ、洗浄液（付記 16）で洗浄し、さらに 2 w/v %牛血清アルブミン加洗浄液を各穴に 0.2mL ずつ加え、37℃で 60 分間反応させ、洗浄液で洗浄したものをを用いる。

3.7.6.4.2 試験方法

3.7.6.1 で得られた各個体の血清について酵素抗体反応（以下「ELISA」という。）を行う。

2 w/v %牛血清アルブミン加洗浄液で 100 倍に希釈した非働化被検血清と、参照陽性血清（付記 17）及び参照陰性血清（付記 18）を抗原固相化プレートの穴にそれぞれ 4 穴、50 μ L ずつ加え、37℃で 60 分間反応させた後、洗浄液で洗浄する。各穴に酵素標識抗体（付記 19）を 50 μ L ずつ加え、37℃で 60 分間反応させた後、洗浄液で洗浄する。基質液（付記 20）を各穴に 100 μ L ずつ加え、遮光して 25℃で 30 分間反応させた後、反応停止液（付記 21）を 50 μ L ずつ加えて反応を停止させ、各穴の吸光度を主波長 492 nm、副波長 630 nm で測定する。

3.7.6.4.3 判定

4 穴の吸光度の最高値と最低値を除いた 2 穴の値の平均値を吸光度値とする。参照陽性血清の吸光度値を O.D.p、参照陰性血清の吸光度値を O.D.n、試験群の血清の吸光度値を O.D.v、対照群の血清の吸光度値を O.D.c とするとき、試験群の 80 %以上が $1 < O.D.v/O.D.p$ でなければならない。また、対照群では、 $O.D.c/O.D.n \leq 2$ 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 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（56℃、30 分間 非働化） 10～20 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 2 BCP 乳糖寒天培地

1,000mL 中

ビーフェキストラクト	3.0 g
ペプトン	5.0 g
乳糖	10.0 g
寒天	10.0 g
ブロムクレゾールパープル	0.025 g
水	残 量

121 °Cで15 分間高圧蒸気滅菌する。pH は 6.8 ～ 7.0 である。

付記3 液体チオグリコール酸培地

1,000mL 中	
L-シスチン	0.5 g
寒天	0.8 g
塩化ナトリウム	2.5 g
ブドウ糖	5.0 g
イースト・エキストラクト	5.0 g
カゼイン製ペプトン	15.0 g
チオグリコール酸ナトリウム	0.5 g
0.1v/w %レサズリン液	1.0 mL
水	残 量

121 °Cで15 分間高圧蒸気滅菌し、急冷後 25 °Cの暗所に保存する。pH は 7.0 ～ 7.2 を示す。

付記4 細胞増殖用培養液

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 (56 °C、30 分間 非働化)	50 ～ 80 mL
イーグル MEM	残 量

炭酸水素ナトリウムで pH を 7.1 ～ 7.3 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 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6 VAD6.0 液

1,000mL 中	
塩化ナトリウム	8.77 g
リン酸水素二ナトリウム、無水	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 7 参照牛血清アルブミン液 (参照 BSA)

牛血清アルブミン (BSA) を精製水で 1 mg/mL となるように作製した後、下表に準じて調整したものを各濃度の参照 BSA とする。

BSA 濃度 (μ g/mL)	量 比	
	1 mg/mL BSA	透析用液
0	0	1,000
100	100	900
125	125	875
150	150	850
175	175	825
200	200	800

付記 8 反応液 A

a. 1,000mL 中

炭酸ナトリウム	20.0 g
水酸化ナトリウム	4.0 g
水	残 量

b. 100mL 中

硫酸銅 (II) 五水和物	0.5 g
酒石酸カリウム	1.0 g
水	残 量

c. 使用直前に、a : b = 50 : 1 の割合で混合したものを反応液 A とする。

付記 9 反応液 B

フェノール試薬を水で 1 mol/L に調整する。

付記 10 中和試験用希釈液

1,000mL 中

イースト・エキストラクト	1 g
ラクトアルブミン水解物	5 g
牛胎子血清	100 mL
アール液	残 量

炭酸水素ナトリウムで pH を 6.8 ~ 7.3 に調整する。

必要最少量の抗生物質を加えてもよい。

付記 11 第 1 次重層寒天培地

1,000mL 中

寒天	7 g
トリプトース・ホスフェイト・ブロス	2.95 g

牛胎子血清 50 mL
F12 培地 残 量
炭酸水素ナトリウムで pH を 7.1 ～ 7.3 に調整する。
必要最少量の抗生物質を加えてもよい。

付記 12 第 2 次重層寒天培地
第 1 次重層寒天培地に 0.5w/v % のニュートラルレッドを 2 vol % となるように加えたもの

付記 13 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増殖させて得た培養液で、赤血球凝集価 128 倍以上のもの

付記 14 gp70 精製抗原
組換え大腸菌で発現させた猫白血病ウイルス gp70 を精製したものであり、 -20°C で保存する。
本抗原を用いて ELISA を実施したときの O.D. 値が、参照陽性血清で 0.6 ～ 0.9、参照陰性血清で 0.1 以下の実測値を示すように炭酸緩衝液で希釈して使用する。

付記 15 炭酸緩衝液
1,000mL 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 は 9.6 であり、 $2 \sim 5^{\circ}\text{C}$ で保存し、1 週間以内に使用する。

付記 16 洗浄液
1,000mL 中
塩化ナトリウム 8.0 g
塩化カリウム 0.2 g
リン酸二水素カリウム 0.2 g
リン酸水素二ナトリウム、無水 1.15g
ポリソルベート 20 0.5 mL
水 残 量

付記 17 参照陽性血清
精製抗原 0.075 mg をアジュバントとともに体重約 100g のラットに 3 週間隔 2 回注射して得られたラットの血清をプールし 100 倍に希釈したもので、抗原固相化プレートを用いて ELISA を実施したとき、O.D. 値が 0.6 ～ 0.9 を示すもの

付記 18 参照陰性血清
非免疫ラットの血清を 100 倍に希釈したもので、抗原固相化プレートを用いて ELISA を実施したとき、O.D. 値が 0.1 以下を示すもの

付記 19 酵素標識抗体
ペルオキシダーゼ標識抗ラット IgG (H+L) 抗体で、抗原固相化プレートを用いて ELISA を実施したとき、参照陽性血清の O.D. 値が 0.6 ～ 0.9、参照陰性血清の O.D. 値が 0.1 以下を示すよう

に調整したもの

付記 20 基質液

o-フェニレンジアミン二塩酸塩 10 mg をリン酸クエン酸緩衝液 25 mL に溶解したものであり、遮光保存する。使用直前に過酸化水素水を 10 μ L 添加して使用する。

付記 21 反応停止液

濃硫酸 56.1 mL を精製水 440 mL 中に攪拌しながら溶解し、最終的に全体量 500 mL に調整したもの