

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・猫クラミジア感染症混合（油性アジュバント加）不活化ワクチン

平成22年 7月12日(告示第1038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、猫汎白血球減少症ウイルス、猫白血病ウイルス及びクラミドフィラ・フェリスをそれぞれ培養細胞で増殖させて得た培養液をそれぞれ不活化したもの又は濃縮したものを混合し、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

2.1.1.1 名称

猫ウイルス性鼻気管炎ウイルス 605 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

2.1.2.1 名称

猫カリシウイルス 255 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

2.1.3.1 名称

猫汎白血球減少症ウイルス CU-4 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、豚の赤血球を凝集する。

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

2.1.4.1 名称

猫白血病ウイルス 1161E 株持続感染細胞株又はこれと同等と認められた株

2.1.4.2 性状

猫に接種すると、猫白血病ウイルスによる持続性ウイルス血症を発症する。

2.1.4.3 継代及び保存

製造用猫白血病ウイルス持続感染原株細胞及び種細胞は、適当と認められた培地で継代する。

製造用猫白血病ウイルス持続感染細胞の継代は、原株細胞から 35 代以内でなければならない。

原株細胞及び種細胞は、凍結して液体窒素中で保存する。

2.1.5. クラミドフィラ・フェリス

2.1.5.1 名称

クラミドフィラ・フェリス Cello 株又はこれと同等と認められた株

2.1.5.2 性状

猫に接種すると、結膜炎又は角膜炎を発症する。

2.1.5.3 継代及び保存

原株及び種菌は発育鶏卵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、種菌では 2 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 以下又は凍結乾燥して 5°C 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

2.2.4.1 培養細胞

製造用猫白血病ウイルス持続感染細胞又は製造に適当と認められた培養細胞を用いる。

2.2.4.2 培養液

製造に適当と認められた培養液を用いる。

2.2.5. クラミドフィラ・フェリス

2.2.5.1 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。

2.2.5.2 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 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採取した培養液又はそ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 3.2.2.1 の試験を行う。

2.3.1.3 不活化

ウイルス浮遊液に相当と認められた不活化剤を加えてウイルスを不活化し、不活化ウイルス液とする。不活化後、不活化剤を中和することができる。また、不活化ウイルス液を濃縮してもよい。不活化ウイルス液又は不活化濃縮ウイルス液を原液とする。

原液について 3.3 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又はそ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

ウイルス浮遊液に相当と認められた不活化剤を加えてウイルスを不活化し、不活化ウイルス液とする。不活化後、不活化剤を中和することができる。また、不活化ウイルス液を濃縮してもよい。不活化ウイルス液又は不活化濃縮ウイルス液を原液とする。

原液について 3.3 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に接種し、培養後、ウイルスの増殖極期に採取した培養液又はそ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

ウイルス浮遊液に相当と認められた不活化剤を加えてウイルスを不活化し、不活化ウイルス液とする。不活化後、不活化剤を中和することができる。また、不活化ウイルス液を濃縮してもよい。不活化ウイルス液又は不活化濃縮ウイルス液を原液とする。

原液について 3.3 の試験を行う。

2.3.4 猫白血病ウイルス

2.3.4.1 猫白血病ウイルス持続感染細胞の培養

製造用猫白血病ウイルス持続感染細胞を培養後、数日間培養して採取した培養液又はそ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 3.2.3.1 の試験を行う。

2.3.4.2 不活化

ウイルス浮遊液に相当と認められた不活化剤を加えてウイルスを不活化し、不活化ウイルス液とする。不活化後、不活化剤を中和することができる。また、不活化ウイルス液を濃縮してもよい。不活化ウイルス液又は不活化濃縮ウイルス液を原液とする。

原液について 3.3 の試験を行う。

2.3.5 クラミドフィラ・フェリス

2.3.5.1 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。クラミドフィラ・フェリ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。

2.3.5.2 クラミドフィラ・フェリスの培養

種菌を培養細胞に接種し、培養後、クラミドフィラ・フェリスの増殖極期に採取した培養液又はその遠心上清をクラミドフィラ・フェリス浮遊液とする。

クラミドフィラ・フェリス浮遊液について、3.2.1 及び 3.2.3.2 の試験を行う。

2.3.5.3 不活化

クラミドフィラ・フェリス浮遊液に相当と認められた不活化剤を加えてクラミドフィラ・フェリスを不活化し、不活化クラミドフィラ・フェリス液とする。不活化クラミドフィラ・フェリス液を濃縮してもよい。不活化クラミドフィラ・フェリス液又は不活化濃縮クラミドフィラ・フェリス液を原液とする。

原液について 3.3 の試験を行う。

2.4 最終バルク

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、猫白血病ウイルス原液及びクラミドフィラ・フェリス原液を混合し、濃度を調整し、油性アジュバント又はこれと同等と認められたアジュバントを加え、混合したものを最終バルクとする。この場合、相当と認められた保存剤を添加することができる。

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、3.4 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。

静置培養の場合は、個別培養細胞の 1% 以上を、浮遊培養の場合は 500mL 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、ウイルス又はクラミドフィラ・フェリスを接種することなく、37 °C 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、0.1 vol % 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 ウイルス浮遊液及びクラミドフィラ・フェリス浮遊液の試験

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0.1mLずつをそれぞれ4本（穴）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日間回転又は静置培養し、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1 mL中10^{6.0}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。

3.2.2.2 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（穴）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日間回転又は静置培養し、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1 mL中10^{7.0}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。

3.2.2.3 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

検体を細胞増殖用培養液（付記2）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（穴）以上の培養細胞浮遊液に接種し、細胞が完全に単層を形成した後、ウイルス増殖用培養液と交換し、37℃で7日間回転又は静置培養する。この培養液に等量の牛アルブミン加ホウ酸緩衝食塩液（付記3）を加える。さらにこの混合液と等量のVAD6.0液（付記4）で調整した0.3～0.5vol%豚赤血球浮遊液を加え、2～5℃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。

3.2.2.3.3 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^{5.0}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。

3.2.3 有効抗原定量試験

3.2.3.1 猫白血病ウイルス抗原定量試験

3.2.3.1.1 試験材料

3.2.3.1.1.1 試料

検体を試料とする。

3.2.3.1.1.2 試験方法

3.2.3.1.2.1 固相化プレートの作成

抗猫白血病ウイルス抗体（付記 5）をコーティング緩衝液（付記 6）で適当な濃度に希釈したものを 100 μ L ずつ 96 穴プレートに分注し、2～7℃で一夜反応させる。液を除き、0.3vol %ポリソルベート 20 加リン酸緩衝食塩液（付記 7。以下「0.3 %ポリソルベート 20/PBS」という。）で洗浄した後、ブロッキング緩衝液（付記 8）を 200 μ L ずつ加え、37℃で 60～75 分間反応させる。この抗体固相化プレートを 0.3 %ポリソルベート 20/PBS を用いて洗浄する。

3.2.3.1.2.2 試料の調製

試料希釈用プレートの A 列の 4 穴に 18vol %ポリソルベート 20 加リン酸緩衝食塩液（付記 9。以下「18 %ポリソルベート 20/PBS」という。）を 5 μ L ずつ分注し、B～G 列の各 4 穴には 0.3 %ポリソルベート 20/PBS を 150 μ L ずつ分注する。試料及び参照ワクチン 1（付記 10）を 0.01mol/L リン酸緩衝食塩液（付記 11）で 35 倍に希釈したものを A 列に 300 μ L ずつそれぞれ 2 穴に分注する。A 列より 150 μ L を採り B 列に移し、試料及び参照ワクチン 1 を 2 倍に希釈する。この希釈列で G 列まで 2 倍階段希釈を行う。H 列には 0.01mol/L リン酸緩衝食塩液で 35 倍に希釈した陰性対照ワクチン（付記 12）にポリソルベート 20 を最終濃度 0.3 %となるように加えたものを 150 μ L ずつ 2 穴に分注する。

3.2.3.1.2.3 反応

試料希釈用プレートをよく攪拌した後、洗浄液を除いた固相化プレートに各穴 100 μ L ずつ移し、37℃で 16～20 時間反応させる。反応後、固相化プレートより希釈試料、希釈参照ワクチン 1 及び陰性対照ワクチン液を除き、0.3 %ポリソルベート 20/PBS で洗浄する。洗浄液を除き、標識抗体希釈液（付記 13）で 50 倍に希釈した抗 gp70 モノクローナル抗体（付記 14）を各穴に 100 μ L ずつ分注し、37℃で 60 分間反応させ、0.3 %ポリソルベート 20/PBS で洗浄する。標識抗体希釈液で 200 倍に希釈したビオチン標識抗マウス IgG 血清（付記 15）に 2 vol %濃度に牛胎子血清を加えた標識抗体液を 100 μ L ずつ分注し、37℃で 60 分間反応させた後、0.3 %ポリソルベート 20/PBS で洗浄する。次に酵素液（付記 16）を各穴に 100 μ L ずつ分注し、37℃で 30 分間反応させ、0.3 %ポリソルベート 20/PBS で洗浄する。さらに基質液（付記 17）を各穴に 100 μ L ずつ分注し、37℃で 10～30 分間反応させる。

3.2.3.1.2.4 吸光度測定

主波長を 405nm、補正波長を 490nm で吸光度を測定する。

3.2.3.1.3 判定

参照ワクチン 1 中の gp70 抗原量を 1.0 として、試料中の gp70 抗原量の相対量を統計学的計算方法（付記 18）により算出するとき、抗原相対量は、1.0 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、その試験方法とする。

3.2.3.2 クラミドフィラ・フェリス抗原定量試験

3.2.3.2.1 試験材料

3.2.3.2.1.1 試料

検体を出力 4～9 ワットで 1 分間超音波処理したものを試料とする。なお、参照ワクチン 2（付記 19）及び陰性対照ワクチンも同様の処理を行う。

3.2.3.2.2 試験方法

3.2.3.2.2.1 固相化プレートの作成

抗猫クラミドフィラモノクローナル抗体（付記 20）をコーティング緩衝液で適当な濃度に希釈したものを 100 μ L ずつ 96 穴プレートに分注し、2～7℃で一夜反応させる。液を除き、0.3 %ポリソルベート 20/PBS で洗浄した後、ブロッキング緩衝液を 200 μ L ずつ加え、37℃で 60～75 分間反応させる。この抗体固相化プレートを 0.3 %ポリソルベート 20/PBS を用いて洗浄する。

3.2.3.2.2.2 試料調整

試料希釈用プレートの A 列の 4 穴に 18 %ポリソルベート 20/PBS を 6 μ L ずつ分注し、B ~ G 列の各 4 穴には 0.3 %ポリソルベート 20/PBS を 150 μ L ずつ分注する。試料及び参照ワクチン 2 を A 列に 350 μ L ずつそれぞれ 2 穴に分注する。A 列より 200 μ L を採り B 列に移し、試料及び参照ワクチン 2 を 1.75 倍に希釈する。この希釈列で G 列まで 1.75 倍階段希釈を行う。H 列には超音波処理済み陰性対照ワクチンにポリソルベート 20 を最終濃度 0.3vol %となるように加え、150 μ L ずつ 2 穴に分注する。

3.2.3.2.2.3 反応

試料希釈用プレートをよく攪拌した後、洗浄液を除いた固相化プレートに各穴 100 μ L ずつ移し、37 $^{\circ}$ C で 16 ~ 20 時間反応する。反応後、固相化プレートより希釈試料、希釈参照ワクチン 2 及び陰性対照ワクチン液を除き、0.3 %ポリソルベート 20/PBS で洗浄する。洗浄液を除き、標識抗体希釈液で 1,600 倍に希釈したビオチン標識抗猫クラミドフィラモノクローナル抗体（付記 21）を各穴に 100 μ L ずつ分注し、37 $^{\circ}$ C で 60 分間反応させ、0.3 %ポリソルベート 20/PBS で洗浄する。次に酵素液を各穴に 100 μ L ずつ分注し、37 $^{\circ}$ C で 30 分間反応させ、0.3 %ポリソルベート 20/PBS で洗浄する。さらに TMB 基質液（付記 22）を各穴に 100 μ L ずつ分注し、37 $^{\circ}$ C で 20 分間反応させる。

3.2.3.2.2.4 吸光度測定

主波長を 650nm、補正波長を 490nm で吸光度を測定する。

3.2.3.2.3 判定

参照ワクチン 2 中のクラミドフィラ・フェリス抗原量を 1.0 として、試料中のクラミドフィラ・フェリス抗原量の相対量を統計学的計算方法により算出するとき、抗原相対量は、1.0 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、その試験方法とする。

3.3 原液の試験

3.3.1 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。

3.3.2 不活化試験

3.3.2.1 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不活化試験

3.3.2.1.1 試験材料

3.3.2.1.1.1 試料

検体 2 mL 以上を 100 倍量以上のリン酸緩衝食塩液（付記 23）を用い、4 $^{\circ}$ C で一夜透析し、不活化剤を除去したものを試料とする。

3.3.2.1.1.2 培養細胞

猫腎継代細胞を用いる。

3.3.2.1.2 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 150cm² 以上の培養びんに 37 $^{\circ}$ C 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と交換し、7 日間培養後次代に継代し、7 日間観察する。

観察最終日に培養びんの培養液を採取し、これに等量の牛アルブミン加ホウ酸緩衝食塩液を加える。さらにこの混合液と等量の VAD6.0 液で調整した 0.3 ~ 0.5vol %豚赤血球浮遊液を加え、凝集の有無を観察する。

3.3.2.1.3 判定

培養細胞に CPE、培養液に赤血球の凝集を認めない場合、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。

3.3.2.2 猫白血病ウイルス不活化試験

3.3.2.2.1 試験材料

3.3.2.2.1.1 試料

3.3.2.1.1.1 の試料と同様に処理したものを試料とする。

3.3.2.2.1.2 培養細胞

CC81 細胞を用いる。

3.3.2.2.2 試験方法

試料の全量を 1 mLにつき25cm²以上のDEAE-デキストラン溶液（付記24）で処理したDEAE-デキストラン溶液処理細胞（付記25）に接種し、37°Cで60分間吸着する。試料を除き細胞表面を洗浄後、増殖用培養液を加えて37°Cで12日間培養し、観察する。ただし、増殖用培養液は4日間間隔で更新する。

3.3.2.2.3 判定

培養細胞にフォーカスの形成を認めない場合、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。

3.3.2.3 クラミドフィラ・フェリス不活化試験

3.3.2.3.1 試験材料

3.3.2.3.1.1 試料

3.3.2.1.1.1 の試料と同様に処理したものを試料とする。

3.3.2.3.1.2 発育鶏卵

生ワクチン製造用材料の規格1.1由来の6～7日齢のものを用いる。

3.3.2.3.2 試験方法

試料0.2mLずつを10個の発育鶏卵の卵黄嚢内に接種し、37°Cで7日間培養し、観察する。

3.3.2.3.3 判定

鶏胚は、正常に発育しなければならない。

鶏胚の死亡を認めないとき、活性クラミドフィラ・フェリス陰性と判定する。

試料に活性クラミドフィラ・フェリスを認めてはならない。

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、固有の色調及び粘調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。

3.4.2 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 チメロサール定量試験

チメロサール添加製剤については、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て、一般試験法のチメロサール定量法を準用して試験するとき、適合しなければならない。

3.4.5 ホルマリン定量試験

ホルマリン添加製剤については、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て、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0.2vol%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、注射後の体重測定は5日目とする。

3.4.7 有効抗原定量試験

3.2.3.1及び3.2.3.2を準用して試験するとき、適合しなければならない。

3.4.8 安全試験

3.4.8.1 試験材料

3.4.8.1.1 注射材料

試験品を注射材料とする。

3.4.8.1.2 試験動物

6 か月齢未満の猫又はこれと同等の感受性を有する動物を用いる。

3.4.8.2 試験方法

注射材料を3頭には2頭分ずつを左右の頸部皮下に、3頭には2頭分ずつを左右の内股部筋肉内に注射し、14日間観察する。

3.4.8.3 判定

観察期間中、一過性の軽度な接種反応を認めても、その他の異常を認めてはならない。

3.4.9 力価試験

3.4.9.1 猫ウイルス性鼻気管炎力価試験

3.4.9.1.1 試験材料

3.4.9.1.1.1 注射材料

試験品を注射材料とする。

3.4.9.1.1.2 試験動物

体重約100gのラットを用いる。

3.4.9.1.1.3 培養細胞

猫腎継代細胞を用いる。

3.4.9.1.1.4 中和試験用ウイルス

適当と認められた猫ウイルス性鼻気管炎ウイルスを用いる。

3.4.9.1.2 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頭分ずつを試験群の大腿部筋肉内に注射し、3週後に試験群及び対照群から採血する。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、ウイルス増殖用培養液で2倍階段希釈する。各希釈血清と0.05mL中に約60PFU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とウイルス増殖用培養液とを等量混合し、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0.05mLずつを24穴プレートの2穴の培養細胞に接種し、37°Cで60分間静置した後、混合液を除き、第1次重層寒天培地（付記26）を重層し、37°C 5 vol%炭酸ガス下で2日間培養する。培養後、さらに第2次重層寒天培地（付記27）を重層し、37°Cで24時間培養する。

3.4.9.1.3 判定

ブラック数がウイルス対照の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、すべて8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。

3.4.9.2 猫カリシウイルス感染症力価試験

3.4.9.2.1 試験材料

3.4.9.2.1.1 試験動物

3.4.9.1の試験に用いた動物を用いる。

3.4.9.2.1.2 中和試験用ウイルス

適当と認められた猫カリシウイルスを用いる。

3.4.9.2.1.3 培養細胞

猫腎継代細胞を用いる。

3.4.9.2.2 試験方法

3.4.9.1.2で得られた各個体の血清について中和試験を実施する。

各個体の血清を非働化し、ウイルス増殖用培養液で2倍階段希釈する。各希釈血清と0.025mL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0.025mLずつをそれぞれ96穴プレートの4穴の培養細胞に接種し、37°Cで60分間静置した後、ウイルス増殖用培養液を加え、37°Cで7日間静置培養する。

3.4.9.2.3 判定

CPEを阻止したものを陽性として、4穴中2穴以上CPEの出現を抑制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、幾可平均値で4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。

3.4.9.3 猫汎白血球減少症力価試験

3.4.9.3.1 試験材料

3.4.9.3.1.1 試験動物

3.4.9.1の試験に用いた動物を用いる。

3.4.9.3.1.2 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28）を用いる。

3.4.9.3.2 試験方法

3.4.9.1.2で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。

各個体の血清を非働化し、25w/v%カオリン液及び豚赤血球で処理した後、2倍階段希釈する。各希釈血清に8単位の赤血球凝集抗原を加え、常温で60分間処理し、0.3～0.5vol%豚赤血球浮遊液を加え、2～5℃で一夜処理し、赤血球凝集の有無を観察する。

3.4.9.3.3 判定

赤血球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、すべて64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 20.0 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。

必要最小量の抗生物質を加えてもよい。

付記2 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 50.0～100 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。

必要最小量の抗生物質を加えてもよい。

付記3 牛アルブミン加ホウ酸緩衝食塩液（BBS）

A液：BBS

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
溶解後、121℃、15分間高压滅菌し、水酸化ナトリウム液でpHを9.0に調整後2～5℃に保存する。

B液：5 w/v%牛血清アルブミン
1,000mL中
牛血清アルブミン 50.00 g
水 残 量
溶解後、200nmフィルターを用いてろ過滅菌する。

C液：1 %ゼラチン
1,000mL中
ゼラチン 10.00 g
水 残 量
溶解後、121℃、15分間高压滅菌する。
用時にB液及びC液の最終濃度を0.2vol%及び0.01vol%になるようにA液に加える。

付記4 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
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5 抗猫白血病ウイルス抗体
猫白血病ウイルスを濃縮精製した後、アジュバントと共に牛の皮内及び筋肉内に接種して得られた血清

付記6 コーティング緩衝液
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 1,000 mL
pHを9.6～9.8に調整する。

付記7 0.3vol%ポリソルベート20加リン酸緩衝食塩液
1,000mL中
ポリソルベート20 3 mL
0.01mol/Lリン酸緩衝食塩液 1,000 mL
pHを7.2に調整する。

付記8 ブロッキング緩衝液
1,000mL中
脱脂粉乳 11.5 g

- コーティング緩衝液 1,000 mL
 用時調製し、定性ろ紙を用いてろ過する。
- 付記9 18vol%ポリソルベート20加リン酸緩衝食塩液
 1,000mL中
 ポリソルベート20 180 mL
 0.01mol/Lリン酸緩衝食塩液 820 mL
 pHを7.2に調整する。
- 付記10 参照ワクチン1
 猫白血病参照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11 0.01mol/Lリン酸緩衝食塩液
 1,000mL中
 無水リン酸二水素ナトリウム 0.253 g
 無水リン酸水素二ナトリウム 1.19 g
 塩化ナトリウム 8.5 g
 水 残量
 pHを7.1～7.3に調整する。
- 付記12 陰性対照ワクチン
 ウイルス増殖用培養液について、ワクチンの製造方法と同様に培養液を不活化処理、濃縮及びアジュバントの添加を行ったもの
- 付記13 標識抗体希釈液
 1,000mL中
 脱脂粉乳 11.5 g
 0.3%ポリソルベート20/PBS 1,000 mL
 用時調製し、定性ろ紙を用いて濾過する。
- 付記14 抗gp70モノクローナル抗体
 gp70抗体産生ハイブリドーマ細胞をBALB/cマウスの腹腔内に接種し、得られた腹水を精製したもの
- 付記15 ビオチン標識抗マウスIgG血清
 精製マウスIgGで免疫して得られた血清をアフィニティクロマトグラフィ法で精製し、得られた抗マウスIgG抗体にビオチンを結合させたもの
- 付記16 酵素液
 ストレプトアビジンペルオキシダーゼを標識抗体希釈液で2,000倍に希釈したもの
- 付記17 基質液
 2,2'-アジノビス(3-エチルベンゾチアゾリン-6-スルホン酸) (ABTS) 液
- 付記18 統計学的計算方法

動物医薬品検査所が適当と認めたもの

付記19 参照ワクチン2

クラミドフィラ・フェリス感染症参照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20 抗猫クラミドフィラモノクローナル抗体

クラミドフィラ・フェリスcello株を用いて作製したハイブリドーマ細胞をBALB/cマウスの腹腔内に注射して得られた腹水液を精製して得た抗4E1FD7モノクローナル抗体

付記21 ビオチン標識抗猫クラミドフィラモノクローナル抗体

抗猫クラミドフィラモノクローナル抗体にビオチンを結合させたもの

付記22 TMB 基質液

市販の(3,3',5,5')テトラメチルベンチジン基質液

付記23 リン酸緩衝食塩液

1,000mL中

塩化ナトリウム 8.00 g

塩化カリウム 0.20 g

無水リン酸水素二ナトリウム 1.15 g

リン酸二水素カリウム 0.20 g

水 残量

溶解後、121℃、15分間高压滅菌し、pHを7.0~7.4に調整する。

付記24 DEAE-デキストラン溶液

1,000mL中

DEAE-デキストラン 10.0 g

水 残量

121℃で15分間高压滅菌する。

付記25 DEAE-デキストラン溶液処理細胞

増殖用培養液で200倍に希釈したDEAE-デキストラン溶液を単層を形成した培養細胞の25cm²当たり1 mL加えて、37℃で60分間処理したもの

付記26 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 20 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27 第2次重層寒天培地

第1次重層寒天培地より牛胎子血清を除き、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28 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に感染させて得た培養上清又はこれを不活化したもので、赤血球凝集価128倍以上のもの