

# 猫ウイルス性鼻気管炎・猫カリシウイルス感染症3価・猫汎白血球減少症・猫白血病（組換え型）・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、3種類の猫カリシウイルス、猫汎白血球減少症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不活化したものと組換え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ップ糖蛋白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

##### 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 $-70^{\circ}\text{C}$ 以下又は凍結乾燥して $5^{\circ}\text{C}$ 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 FC-7 株、FC-28 株及び FC-64 株又は製造に適当と認められた3種類の株

##### 2.1.2.1.1 性状

猫腎継代細胞に接種すると CPE を伴って増殖する。

##### 2.1.2.1.2 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 $-70^{\circ}\text{C}$ 以下又は凍結乾燥して $5^{\circ}\text{C}$ 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 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 $-70^{\circ}\text{C}$ 以下又は凍結乾燥して $5^{\circ}\text{C}$ 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

##### 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。

#### 2.1.5 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 Fe/C-P8 株又はこれと同等と認められた株

##### 2.1.5.2 性状

L929 細胞又は SL 細胞に接種すると、細胞質内封入体の形成を伴って増殖する。また、発育鶏卵の卵黄嚢内に接種すると増殖し、鶏胚を死亡させる。

##### 2.1.5.3 継代及び保存

原株及び種菌は、SL 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℃以下又は凍結乾燥して5℃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。

##### 2.2.5 クラミドフィラ・フェリス

###### 2.2.5.1 培養細胞

SL 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

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 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、培養した細胞を個体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。

個体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 の試験を行う。

##### 2.3.5.3 不活化

クラミドフィラ・フェリス浮遊液にホルマリンを加えてクラミドフィラ・フェリスを不活化し、その遠心上清を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 3.5.2.4 の試験を行う。

#### 2.3.6 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 3 種類、猫汎白血球減少症ウイルス原液、組換え大腸菌発現猫白血病ウイルス gp70 原液及びクラミドフィラ・フェリス原液を混合し、7 種混合原液とする。

7 種混合原液について、3.6 の試験を行う。

#### 2.4 最終バルク

7 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 ウイルス感染細胞上清、ウイルス浮遊液又はクラミドフィラ・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、TCID<sub>50</sub>を算出する。

検体のウイルス含有量は、1 mL中10<sup>7.0</sup>TCID<sub>50</sub>以上でなければならない。

### 3.2.2.2 猫カリシウイルス各株の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、TCID<sub>50</sub>を算出する。

検体のウイルス含有量は、1 mL中10<sup>8.5</sup>TCID<sub>50</sub>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℃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℃で60分間吸着後、細胞増殖用培養液を加え、37℃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℃で接種後10日間回転培養した後、1 vol %豚赤血球浮遊液を0.2mL加え、2～5℃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、TCID<sub>50</sub>を算出する。

検体のウイルス含有量は、1 mL中10<sup>6.25</sup>TCID<sub>50</sub>以上でなければならない。

### 3.2.3 クラミドフィラ・フェリス含有量試験

#### 3.2.3.1 試験材料

##### 3.2.3.1.1 試料

検体をクラミドフィラ・フェリス増殖用培養液で10倍階段希釈し、各段階の希釈液を試料とする。

##### 3.2.3.1.2 発育鶏卵

生ワクチン製造用材料の規格1.1の5～7日齢のものを用いる。

### 3.2.3.2 試験方法

試料の 0.1mL ずつをそれぞれ 5 個以上の発育鶏卵の卵黄嚢内に接種し、37℃で 10 日間培養し、観察する。

### 3.2.3.3 判定

鶏胚の死亡を感染とみなし、ELD<sub>50</sub> を算出する。ただし、接種後 3 日以内に鶏胚が死亡したものは除外する。

検体のクラミドフィラ・フェリス含有量は、1 mL 中 10<sup>4.9</sup>ELD<sub>50</sub>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℃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 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℃で 48 時間培養した後、新しい培地に 1 mL を継代し、37℃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 25cm<sup>2</sup> 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。

###### 3.5.2.1.3 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 猫カリシウイルス各株の不活化試験

##### 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 25cm<sup>2</sup> 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。

#### 3.5.2.2.3 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 °Cで一夜透析し、不活化剤を除去したものを試料とする。

##### 3.5.2.3.1.2 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<sup>5</sup> 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 25cm<sup>2</sup> 以上の培養びんで 37 °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。

#### 3.5.2.4 クラミドフィラ・フェリス不活化試験

##### 3.5.2.4.1 試験材料

##### 3.5.2.4.1.1 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 °Cで一夜透析し、不活化剤を除去したものを試料とする。

##### 3.5.2.4.1.2 発育鶏卵

生ワクチン製造用材料の規格 1.1 の 5～7 日齢のものを用いる。

##### 3.5.2.4.2 試験方法

試料を 5 個以上の発育鶏卵の卵黄嚢内に発育鶏卵 1 個当たり 0.4mL を上限として接種し、37 °Cで 6 日間培養し、観察する。6 日目に生存している発育鶏卵を 2～5 °Cで一夜静置して卵黄嚢を採取し、リン酸緩衝食塩液で 10w/v % 乳剤として 1,300G、10 分間遠心し、その上清の 0.1mL を 5 個以上の発育鶏卵の卵黄嚢内に接種し、37 °Cで 6 日間培養し、観察する。同様に 3 代目の継代を行い、37 °Cで 10 日間培養し、観察する。ただし、1～3 代目ともに、接種後 3 日以内に鶏胚が死亡したものは除外する。死亡した鶏胚についても、確認のための継代を行う。

##### 3.5.2.4.3 判定

鶏胚は、正常に発育しなければならない。

3 代目まで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。

接種後 4 日目以後に鶏胚の死亡を認めた場合、同様に継代し、培養、観察するとき、鶏胚の死亡を認めなければ、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。

#### 3.5.3 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里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  $\mu$  L に 0.1w/v %牛血清アルブミン加里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  $\mu$  L ずつ加え、37 °C 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（以下「参照 BSA」という。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  $\mu$  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  $\mu$  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  $\mu$  L ずつ入れ、30 分～2 時間感作したものについて、波長 550nm 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。

検体 1 mL 中の蛋白量は、0.5mg 以上でなければならない。

#### 3.6 7 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。

#### 3.7 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

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、モルモットにおける観察期間は 10 日間とする。

##### 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 2 頭を試験群、2 頭を対照群とする。注射材料を試験群の 2 頭の頸背部皮下に 5 mL ずつ



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100g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℃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℃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℃ 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℃で24時間培養し、観察する。

##### 3.7.6.1.3 判定

被検血清のプラック数の平均値がウイルス対照のプ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

試験品を注射材料とする。

###### 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のそれぞれの製造用株を用いる。

##### 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200TCID<sub>50</sub>を含む中和試験用ウイルス液を等量混合し、37℃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℃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℃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 ED<sub>50</sub> で求める。

試験群のそれぞれの株に対する中和抗体価は、すべての個体で 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。

被検血清を 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 50 μL 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（付記 17）を各穴に 200 μL ずつ加え、37℃で 60 分間反応させ、洗浄液で洗浄したものを用いる。

#### 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、猫白血病参照陽性血清（付記 18）及び猫白血病参照陰性血清（付記 19）を抗原固相化プレートの穴にそれぞれ 4 穴、50 μL ずつ加え、37℃で 60 分間反応させた後、洗浄液で洗浄する。各穴に猫白血病 ELISA 用酵素標識抗体（付記 20）を 50 μL 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 21）を各穴に 100 μL 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 23）を 50 μL ずつ加えて反応を停止させ、各穴の吸光度を主波長 492nm、副波長 630nm 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。

猫白血病参照陽性血清の吸光度値を O.D.p、猫白血病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。

### 3.7.6.5 猫クラミジア感染症力価試験

### 3.7.6.5.1 試験材料

#### 3.7.6.5.1.1 試験動物

3.7.6.1 の試験に用いた動物を用いる。

#### 3.7.6.5.1.2 クラミドフィラ・フェリス固相化プレート

クラミドフィラ・フェリス ELISA 用抗原（付記 23）を炭酸緩衝液で希釈し、96 穴プレートの各穴に 50  $\mu$  L ずつ加え、37  $^{\circ}$ C で 60 分間反応させ、洗浄液で洗浄し、さらに 2 w/v % スキムミルク加洗浄液（付記 24）を各穴に 200  $\mu$  L ずつ加え、37  $^{\circ}$ C で 60 分間反応させ、洗浄液で洗浄したものを用いる。

#### 3.7.6.5.2 試験方法

3.7.6.1 で得られた各個体の血清について ELISA 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、クラミドフィラ・フェリス参照陽性血清（付記 25）及びクラミドフィラ・フェリス参照陰性血清（付記 26）をクラミドフィラ・フェリス固相化プレートの穴にそれぞれ 4 穴、50  $\mu$  L ずつ加え、37  $^{\circ}$ C で 60 分間反応させた後、洗浄液で洗浄する。各穴にクラミドフィラ・フェリス ELISA 用酵素標識抗体（付記 27）を 50  $\mu$  L ずつ加え、37  $^{\circ}$ C で 60 分間反応させた後、洗浄液で洗浄する。基質液を各穴に 100  $\mu$  L ずつ加え、遮光して 25  $^{\circ}$ C で 30 分間反応させた後、反応停止液を 50  $\mu$  L ずつ加えて反応を停止させ、各穴の吸光度を主波長 492nm、副波長 630nm で測定する。

#### 3.7.6.5.3 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。

クラミドフィラ・フェリス参照陽性血清の吸光度値を O.D.p、クラミドフィラ・フェリス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 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 0.025g

水 残 量

121  $^{\circ}$ 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 である。

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	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
無水リン酸二ナトリウム	5.68 g
リン酸二水素ナトリウム二水和物	40.56 g
水	残 量

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 ( $\mu$ 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

使用直前に a : b = 50 : 1 の割合で混合する。

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	20 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

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 を実施したときの吸光度値が、猫白血病参照陽性血清で 0.6 ~ 0.9、猫白血病参照陰性血清で 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、4℃に保存し、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 1.15 g

ポリソルベート 20 0.5 mL

水 残 量

付記 17 2 w/v %牛血清アルブミン加洗浄液

牛血清アルブミン 2 g を洗浄液 100mL で溶解したもの

付記 18 猫白血病参照陽性血清

gp70 精製抗原で免疫したラットの血清を 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、吸光度値が 0.6 ~ 0.9 を示すもの

付記 19 猫白血病参照陰性血清

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、吸光度値が 0.1 以下を示すもの

付記 20 猫白血病 ELISA 用酵素標識抗体

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、参照陽性血清の吸光度値が 0.6 ~ 0.9、参照陰性血清の吸光度値が 0.1 以下を示すように調整したもの

付記 21 基質液

o-フェニレンジアミン二塩酸塩 10mg をリン酸クエン酸緩衝液 (付記 28) 25mL 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  $\mu$  L 添加して使用する。

付記 22 反応停止液

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

付記 23 クラミドフィラ・フェリス ELISA 用抗原

精製したクラミドフィラ・フェリスを 0.5vol%ザルコシル存在下で、37℃で 30 分間感作したものであり、-20℃で保存する。

この抗原を用いて ELISA を実施したとき、吸光度値が、クラミドフィラ・フェリス参照陽性血清で 0.2 ～ 0.5、クラミドフィラ・フェリス参照陰性血清で 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 24 2 w/v % スキムミルク加洗浄液

スキムミルク 2 g を洗浄液 100mL で溶解したもの

付記 25 クラミドフィラ・フェリス参照陽性血清

$10^{3.5}$ ELD<sub>50</sub> のクラミドフィラ・フェリスを不活化して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、クラミドフィラ・フェリス固相化プレートを用いて ELISA を実施したとき、吸光度値が 0.2 ～ 0.5 を示すもの

付記 26 クラミドフィラ・フェリス参照陰性血清

非免疫ラットの血清を 100 倍に希釈したもので、クラミドフィラ・フェリス固相化プレートを用いて ELISA を実施したとき、吸光度値が 0.1 以下を示すもの

付記 27 クラミドフィラ・フェリス ELISA 用酵素標識抗体

ペルオキシダーゼ標識抗ラット IgG (H+L) 抗体で、クラミドフィラ・フェリス固相化プレートを用いて ELISA を実施したとき、クラミドフィラ・フェリス参照陽性血清の吸光度値が 0.2 ～ 0.5、クラミドフィラ・フェリス参照陰性血清の吸光度値が 0.1 以下を示すように調整したもの

付記 28 リン酸クエン酸緩衝液

1,000mL 中

クエン酸 (無水) 4.67 g

リン酸水素二ナトリウム十二水和物 19.95 g

水 残 量

pH を 5.0 に調整する。