

犬パルボウイルス感染症生ワクチン（シード）

平成22年4月22日（告示第646号）新規追加
令和2年6月30日（告示第1246号）一部改正

1 定義

シードロット規格に適合した弱毒犬パルボウイルスを同規格に適合した株化細胞で増殖させて得たウイルス液を調製した液状ワクチン又は凍結乾燥したワクチンである。

2 製法

2.1 製造用株

2.1.1 名称

弱毒犬パルボウイルスNL-35-D-LP 株又はこれと同等と認められた株

2.1.2 性状

犬に注射しても病原性を示さない。犬及び猫由来細胞で核内封入体を伴って増殖し、その培養ウイルス液は豚及び猿の赤血球を凝集する。

2.1.3 マスターシードウイルス

2.1.3.1 作製、保存及び小分製品までの最高継代数

マスターシードウイルスは、適当と認められた培養細胞で増殖させ、連続した工程により作製し、保存用の容器に分注する。

分注したマスターシードウイルスは、特定の製造番号又は製造記号を付し、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。ただし、農林水産大臣が特に認めた場合には、その保存温度とする。

マスターシードウイルスについて、3.1.1 の試験を行う。

マスターシードウイルスは、ワクチンの製造以外の目的で継代しない。マスターシードウイルスから小分製品までの最高継代数は、5代以内でなければならない。

2.1.4 ワーキングシードウイルス

2.1.4.1 増殖、継代及び保存

ワーキングシードウイルスは、適当と認められた培養細胞で増殖及び継代する。

ワーキングシードウイルスは、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。

ワーキングシードウイルスについて、3.1.2 の試験を行う。

2.1.5 プロダクションシードウイルス

2.1.5.1 増殖、継代及び保存

プロダクションシードウイルスは、適当と認められた培養細胞で増殖する。

プロダクションシードウイルスを保存する場合は、凍結して -70°C 以下又は凍結乾燥し

て5℃以下で保存する。

プロダクションシードウイルスを保存する場合について、3.1.3 の試験を行う。

2.2 製造用材料

2.2.1 培養細胞

犬腎継代細胞又は製造に相当と認められた株化細胞を用いる。

2.2.2 培養液

製造に相当と認められた培養液を用いる。

2.2.3 マスターセルシード

2.2.3.1 作製、保存及び小分製品までの最高継代数

マスターセルシードは、2.2.2 の培養液で増殖させ、連続した工程により作製し、保存用の容器に分注する。

分注したマスターセルシードは、特定の番号又は製造記号を付し、凍結して-70℃以下で保存する。

マスターセルシードについて、3.2.1 の試験を行う。

マスターセルシードは、ワクチンの製造又は試験以外の目的で継代しない。マスターセルシードからプロダクションセルシードまでの最高継代数は、20代以内でなければならない。

2.2.4 ワーキングセルシード

2.2.4.1 増殖、継代及び保存

ワーキングセルシードは、2.2.2 の培養液で増殖及び継代する。

ワーキングセルシードは、凍結して-70℃以下で保存する。

ワーキングセルシードについて、3.2.2 の試験を行う。

2.2.5 プロダクションセルシード

2.2.5.1 増殖、継代及び保存

プロダクションセルシードは、2.2.2 の培養液で増殖する。

プロダクションセルシードを保存する場合は、凍結して-70℃以下で保存する。

プロダクションシードウイルスを保存する場合について、3.2.3 の試験を行う。

2.3 原液

2.3.1 プロダクションセルシードの培養

1回に処理し、培養した細胞を個別培養細胞とみなす。ウイルス接種前のプロダクションセルシードに異常を認めてはならない。

2.3.2 ウイルスの培養

プロダクションシードウイルスを2.3.1の細胞で培養し、相当と認められた時期に個別培養細胞ごとに採取した培養液、そのろ液、遠心上清又はこれらを濃縮したものを混合し、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

原液に相当と認められた安定剤を加えて混合し、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、乾燥製剤の場合は凍結乾燥して、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 製造用株の試験

3.1.1 マスターシードウイルスの試験

3.1.1.1 同定試験

シードロット規格の1.4.2.1.1.2 を準用して試験するとき、適合しなければならない。

3.1.1.2 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。

3.1.1.3 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。

3.1.1.4 外来性ウイルス否定試験

3.1.1.4.1 共通ウイルス否定試験

一般試験法の外来性ウイルス否定試験法の2.1 及び2.2 を準用して試験するとき、適合しなければならない。

3.1.1.4.2 特定ウイルス否定試験

3.1.1.4.2.1 特定ウイルス否定一般試験

猫由来細胞を用いる場合には、猫白血病ウイルス／猫肉腫ウイルスについて、一般試験法の外来性ウイルス否定試験法の3.1.1 を準用して試験するとき、適合しなければならない。

3.1.1.4.2.2 個別ウイルス否定試験

牛ウイルス性下痢－粘膜病ウイルス、犬パルボウイルス又は猫汎白血球減少症ウイルス及び日本脳炎ウイルス又は狂犬病ウイルスについて、一般試験法の外来性ウイルス否定試験法の3.2.5、3.2.6 及び3.2.9 を準用して試験するとき、適合しなければならない。

3.1.1.5 対象動物を用いた免疫原性試験

一般試験法の対象動物を用いた免疫原性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。

3.1.1.6 対象動物を用いた安全性確認試験

一般試験法の対象動物を用いた安全性確認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。

3.1.1.7 病原性復帰確認試験

一般試験法の病原性復帰確認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。

3.1.2 ワーキングシードウイルスの試験

3.1.2.1 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。

3.1.2.2 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。

3.1.3 プロダクションシードウイルスの試験

3.1.3.1 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。

3.1.3.2 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 株化細胞の試験

3.2.1 マスターセルシードの試験

3.2.1.1 培養性状試験

シードロット規格の2.1.4.2.1.1 を準用して試験するとき、適合しなければならない。

3.2.1.2 起源動物種同定試験

シードロット規格の2.1.4.2.1.2 を準用して試験するとき、適合しなければならない。

3.2.1.3 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。

3.2.1.4 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。

3.2.1.5 外来性ウイルス否定試験

3.2.1.5.1 共通ウイルス否定試験

一般試験法の外来性ウイルス否定試験法の2.1 及び2.2 を準用して試験するとき、適合しなければならない。

3.2.1.5.2 特定ウイルス否定試験

3.2.1.5.2.1 特定ウイルス否定一般試験法

猫由来細胞を用いる場合には、猫白血病ウイルス／猫肉腫ウイルスについて、一般試験法の外来性ウイルス否定試験法の3.1.1 を準用して試験するとき、適合しなければならない。

3.2.1.5.2.2 個別ウイルス否定試験

牛ウイルス性下痢-粘膜病ウイルス、犬パルボウイルス又は猫汎白血球減少症ウイルス及び日本脳炎ウイルス又は狂犬病ウイルスについて、一般試験法の外来性ウイルス否定試験法の3.2.5、3.2.6 及び3.2.9 を準用して試験するとき、適合しなければならない。

3.2.1.6 核学的（染色体）性状試験

シードロット規格の2.1.4.2.1.6.2 を準用して試験するとき、適合しなければならない。

3.2.1.7 腫瘍形成試験／腫瘍原性試験

シードロット規格の2.1.4.2.1.7 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 ワーキングセルシードの試験

3.2.2.1 培養性状試験

シードロット規格の2.1.4.2.1.1 を準用して試験するとき、適合しなければならない。

3.2.2.2 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。

3.2.2.3 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。

3.2.3 プロダクションセルシードの試験

3.2.3.1 培養性状試験

シードロット規格の2.1.4.3.1.1 を準用して試験するとき、適合しなければならない。

3.2.3.2 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。

3.2.3.3 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。

3.3 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 ウイルス含有量試験

3.3.2.1 試験材料

3.3.2.1.1 試料

検体を適当と認められた希釈液で10 倍階段希釈し、各段階の希釈液を試料とする。

3.3.2.1.2 培養細胞

A72 細胞、猫腎継代細胞又は適当と認められた培養細胞を用いる。

3.3.2.1.3 培養液

適当と認められた培養液を用いる。

3.3.2.2 試験方法

試料の0.1mL ずつを、4 本（穴）以上の培養細胞浮遊液に加え、32 °C又は37 °Cで1～3 日間培養後、液交換を行い、さらに6～10 日間培養する。

A72 細胞については、CPE を観察する。猫腎継代細胞については、培養最終日に、各希釈試料の培養液について、これに牛血清アルブミン加ホウ酸緩衝食塩液（付記1）を等量加える。更にこの混合液と等量のVAD6.0 液（付記2）で調整した0.3～0.5vol%豚赤血球を用いて赤血球凝集試験を行う。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。

3.3.2.3 判定

CPE 又は赤血球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^{4.0}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。

3.4 小分製品の試験

次の試験を行う。ただし、液状製剤の場合には、3.4.2 及び3.4.3 の試験を行わない。

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、乾燥製剤にあつては、固有の色調を有する乾燥物でなければならない。液状製剤又は乾燥製剤を溶解したものは、固有の色調を有する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 真空度試験

一般試験法の真空度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。

3.4.3 含湿度試験

一般試験法の含湿度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 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。

3.4.5 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、原液を含む中間工程でマイコプラズマ否定試験を実施する場合には、本試験の実施を省略することができる。

3.4.6 ウイルス含有量試験

3.4.6.1 試験材料

3.4.6.1.1 試料

試験品をウイルス増殖用培養液（付記3）又は適当と認められた希釈液で10 倍階段希釈し、各段階の希釈液を試料とする。

3.4.6.1.2 培養細胞

猫腎継代細胞、NLDK-1 細胞又は適当と認められた培養細胞を用いる。

3.4.6.2 試験方法

試料0.1mL ずつをそれぞれ4本（穴）以上の培養細胞に接種し、猫腎継代細胞では32℃又は37℃で、また、NLDK-1 細胞では37℃でそれぞれ24 時間静置培養した後、ウイルス増殖用培養液と交換し、更に32℃又は37℃で6～10日間培養する。培養後、培養液を採取し、これに等量のホウ酸緩衝食塩液を加え、更にこの混合液と等量の0.5vol%豚赤血球浮遊液を加え、2～5℃で静置した後、観察する。

3.4.6.3 判定

培養液に赤血球凝集を認めたものを感染とみなし、TCID₅₀ を算出する。

試験品のウイルス含有量は、猫腎継代細胞で32 °Cで培養した場合は1頭分当たり10^{5.5}TCID₅₀ 以上、猫腎継代細胞で37 °Cで培養した場合は1頭分当たり10^{5.5}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。

3.4.7 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。

3.4.8 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か月齢未満の犬を用いる。

3.4.8.2 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1頭分を用法に従ってそれぞれ注射し、対照群とともに4週間観察する。ただし、農林水産大臣が特に認めた場合には、その観察期間とする。

3.4.8.3 判定

観察期間中、試験群及び対照群に異常を認めてはならない。

3.4.9 力価試験

3.4.9.1 試験材料

3.4.9.1.1 試験動物

3.4.8 の試験に用いた動物を用いる。

3.4.9.1.2 中和試験用ウイルス又は赤血球凝集抗原

中和試験用ウイルスとして犬パルボウイルスY-1 株又は適当と認められた犬パルボウイルス株を用いる。

赤血球凝集抗原として犬パルボウイルス赤血球凝集抗原（付記4）を用いる。

3.4.9.1.3 培養細胞

猫腎継代細胞を用いる。

3.4.9.2 試験方法

中和試験又は赤血球凝集抑制試験のいずれかの試験を行う。

3.4.9.2.1 中和試験

3.4.8 の試験最終日に試験群及び対照群から得られた血清について中和試験を行う。各試験群の血清は、それぞれ等量をプールする。

各プール血清を非働化し、1 vol%牛胎子血清加リン酸緩衝食塩液又は適当と認められた

希釈液で2倍階段希釈する。各希釈血清と0.1mL 中約200TCID₅₀の中和試験用ウイルス液とを等量混合し、35～37℃で60分間処理後、各混合液0.1mL ずつを4本（穴）以上の培養細胞に接種し、35～37℃で24時間静置培養した後、培養液を交換し、更に35～37℃で6日間培養する。培養最終日に、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食塩液を加え、更にこの混合液と等量のVAD6.0液で調整した0.3～0.5vol%豚赤血球浮遊液を添加し、2～5℃で静置後、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。

3.4.9.2.2 赤血球凝集抑制試験

3.4.8の試験終了時に試験群及び対照群から得られた血清について赤血球凝集抑制試験を行う。各試験群の血清は、それぞれ等量をプールする。

各プール血清を非働化し、25w/v%カオリン液及び豚赤血球を加えて処理した後、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。それぞれ各希釈血清に8単位の犬パルボウイルス赤血球凝集抗原を混合し、常温で60分間処理し、VAD6.0液で調整した0.3～0.5vol%豚赤血球浮遊液を加え4℃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。

3.4.9.3 判定

3.4.9.3.1 中和試験

赤血球凝集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、200倍以上でなければならない。この場合、対照群は、4倍以下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、その抗体価とする。

3.4.9.3.2 赤血球凝集抑制試験

赤血球の凝集が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、32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。ただし、農林水産大臣が特に認めた場合には、その抗体価とする。

4 貯法及び有効期間

有効期間は、製造後1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には、その期間とする。

付記1 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2 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

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3 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4 犬パルボウイルス赤血球凝集抗原

犬パルボウイルスY-1 株又は適当と認められたウイルス株を猫腎継代細胞で増殖させて得た培養上清を不活化したもので、赤血球凝集価が128 倍以上のもの