

ジステンパー・犬アデノウイルス（２型）感染症・犬パ ラインフルエンザ・犬パルボウイルス感染症・犬コロナ ウイルス感染症・犬レプトスピラ病（カニコーラ・イク テロヘモラジー・ヘブドマディス）混合（アジュバント 加）ワクチン（シード）

平成 29 年 6 月 28 日（告示第 1011 号）新規追加

シードロット規格に適合した弱毒ジステンパーウイルス、弱毒犬アデノウイルス（２型）、弱毒犬パラインフルエンザウイルス及び弱毒犬パルボウイルスをそれぞれ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とシードロット規格に適合したレプトスピラ・カニコーラ、レプトスピラ・イクテロヘモラジー及びレプトスピラ・ヘブドマディスの培養菌液を不活化したものの混合液を凍結乾燥したワクチン（以下この項において「混合乾燥ワクチン」という。）と、シードロット規格に適合した犬コロナ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不活化してアルミニウムゲルアジュバント加えたものを混合したワクチン（以下この項において「液状不活化ワクチン」という。）とを組み合わせたワクチンである。

1 小分製品の試験

1.1 無菌試験

混合乾燥ワクチンを液状不活化ワクチンで溶解したもの（以下この項において「混合ワクチン」という。）について、一般試験法の無菌試験法により試験を行い、これに適合しなければならない。

1.2 ウイルス含有量試験

1.2.1 ジステンパーウイルス含有量試験

1.2.1.1 試験材料

1.2.1.1.1 試料

混合乾燥ワクチンを液状不活化ワクチンと同量のリン酸緩衝食塩液又は滅菌蒸留水で溶解する。試験品中のジステンパーウイルス以外のウイルスの各抗血清（付記 1 から 3 まで）を非働化したもので中和したものをウイルス増殖用培養液（付記 4）で 10 倍階段希釈し、各段階の希釈液を試料とする。

1.2.1.1.2 培養細胞

Vero 細胞を用いる。

1.2.1.2 試験方法

試料 0.1mL ずつを 5 本（穴）以上の培養細胞に接種し、34 ～ 38℃で 60 分間吸着させた後、ウイルス増殖用培養液を加え、34 ～ 38℃で 10 日間培養し、観察する。

1.2.1.3 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。

試験品のウイルス含有量は、1 頭分当たり 10^{3.5}TCID₅₀ 以上でなければならない。

1.2.2 犬アデノウイルス（２型）含有量試験

1.2.2.1 試験材料

1.2.2.1.1 試料

混合乾燥ワクチンを液状不活化ワクチンと同量のリン酸緩衝食塩液又は滅菌蒸留水で溶解する。試験品中の犬アデノウイルス（２型）以外のウイルスの各抗血清（付記 2、3 及び 5）を非働化した

もので中和したもの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。

1.2.2.1.2 培養細胞

犬腎継代細胞を用いる。

1.2.2.2 試験方法

試料 0.1mL ずつを 5 本（穴）以上の培養細胞に接種し、34 ～ 38℃で 60 分間吸着後、ウイルス増殖用培養液を加え、34 ～ 38℃で 10 日間培養し、観察する。

1.2.2.3 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。

試験品のウイルス含有量は、1 頭分当たり 10^{5.0}TCID₅₀ 以上でなければならない。

1.2.3 犬パラインフルエンザウイルス含有量試験

1.2.3.1 試験材料

1.2.3.1.1 試料

混合乾燥ワクチンを液状不活化ワクチンと同量のリン酸緩衝食塩液又は滅菌蒸留水で溶解する。試験品中の犬パラインフルエンザウイルス以外のウイルスの各抗血清（付記 1、3 及び 5）を非働化したもので中和したもの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。

1.2.3.1.2 培養細胞

犬腎継代細胞を用いる。

1.2.3.2 試験方法

試料 0.1mL ずつを 5 本（穴）以上の培養細胞に接種し、34 ～ 38℃で 60 分間吸着させた後、ウイルス増殖用培養液を加え、34 ～ 38℃で 7 日間培養し、観察する。培養後、培養液を採取し、これに等量の 0.4vol %モルモット赤血球浮遊液を加え、常温で 20 ～ 40 分間静置し、観察する。

1.2.3.3 判定

培養液に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。

試験品のウイルス含有量は、1 頭分当たり 10^{5.0}TCID₅₀ 以上でなければならない。

1.2.4 犬パルボウイルス含有量試験

1.2.4.1 試験材料

1.2.4.1.1 試料

混合乾燥ワクチンを液状不活化ワクチンと同量のリン酸緩衝食塩液又は滅菌蒸留水で溶解する。試験品中の犬パルボウイルス以外のウイルスの各抗血清（付記 1、2 及び 5）を非働化したもので中和したもの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。

1.2.4.1.2 培養細胞

猫腎継代細胞を用いる。

1.2.4.2 試験方法

試料 0.1mL ずつを 5 本（穴）以上の培養細胞に接種し、34 ～ 38℃で 18 ～ 30 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 34 ～ 38℃で 6 日間培養する。培養後、各本（穴）の培養上清を採取し、犬パルボウイルス特異的ポリメラーゼ連鎖反応（以下この項において「PCR」という。付記 6）を行い、特異的 PCR 産物を電気泳動して観察する。

1.2.4.3 判定

特異的 PCR 産物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、1 頭分当たり 10^{5.0}TCID₅₀ 以上でなければならない。

1.3 毒性限度確認試験

混合ワクチンについて、一般試験法の毒性限度確認試験法 1 により試験を行い、これに適合しなければならない。ただし、判定には注射後 4 日目の体重を用いる。

1.4 不活化試験

1.4.1 試験材料

1.4.1.1 試料

液状不活化ワクチン 2 mL 以上を 100 倍量以上のリン酸緩衝食塩液を用い、2 ～ 5℃で一夜以上透析し、不活化剤を除去したものを試料とする。

1.4.1.2 培養細胞

猫腎継代細胞を用いる。

1.4.2 試験方法

試料を 25cm² 以上の培養細胞 2 本に 1 mL ずつ接種し、34 ～ 38℃で 1 時間吸着させた後、リン酸緩衝食塩液で細胞表面を洗浄する。ウイルス増殖用培養液を加えて 34 ～ 38℃で 5 日間培養した後、接種した培養細胞を継代し、更に 34 ～ 38℃で 7 日間培養し、観察する。

1.4.3 判定

培養細胞に CPE を認めてはならない。

1.5 犬コロナウイルス感染症力価試験

1.5.1 試験材料

1.5.1.1 注射材料

混合ワクチンを注射材料とする。

1.5.1.2 試験動物

体重約 300g のモルモットを用いる。

1.5.1.3 中和試験用ウイルス

適当と認められた犬コロナウイルス株を用いる。

1.5.1.4 培養細胞

猫全胎子継代細胞浮遊液を用いる。

1.5.2 試験方法

試験動物 5 匹を試験群、2 匹を対照群とする。試験群に注射材料 0.5mL ずつを 3 週間間隔で 2 回両後肢に半量ずつ筋肉内注射し、2 回目注射後 7 日目に得られた各個体の血清について中和試験を行う。

被検血清を非働化した後、細胞増殖用培養液（付記 7）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を等量混合し、34 ～ 38℃で 60 分間処理する。各混合液 0.1mL ずつをそれぞれ 1 穴当たり 0.1mL に分注した培養細胞浮遊液 4 穴に接種し、34 ～ 38℃で 5 日間培養し、観察する。

1.5.3 判定

培養細胞の 4 穴中 2 穴以上に CPE の阻止を認めた血清の最高希釈倍数を中和抗体価とする。

試験群の抗体価は、80 % 以上が 8 倍以上でなければならない。この場合、対照群では、2 倍以下でなければならない。

付記 1 抗犬アデノウイルス（2 型）血清

犬アデノウイルス（2 型）V197 株又は製造用株である 96-LP03 株を除く犬アデノウイルス（2 型）株で免疫した兎又はモルモットの血清であって、試験品の犬アデノウイルス（2 型）を完全に中和できるもの。

付記 2 抗犬パラインフルエンザウイルス血清

犬パラインフルエンザウイルス D008 株又は製造用株である T2MD10 株を除く犬パラインフ

ルエンザウイルスで免疫した兎又はモルモットの血清であって、試験品の犬パラインフルエンザウイルスを完全に中和できるもの。

付記 3 抗犬パルボウイルス血清

犬パルボウイルスCPV97-008株又は製造用株であるHD037株を除く犬パルボウイルスで免疫した兎又はモルモットの血清であって、試験品の犬パルボウイルスを完全に中和できるもの。

付記 4 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

10 ～ 20 mL

イーグル MEM

残 量

炭酸水素ナトリウムで pH を 7.0 ～ 7.4 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 抗ジステンパーウイルス血清

ジステンパーウイルスオンダーステポート株又は製造用株である KDK-1/135 株を除くジステンパーウイルスで免疫した兎又はモルモットの血清であって、試験品のジステンパーウイルスを完全に中和できるもの。

付記 6 犬パルボウイルス特異的ポリメラーゼ連鎖反応

犬パルボウイルスのカプシドたん白 VP-1 及び VP-2 を含む領域を特異的に検出する PCR 法で、0.5kbp の特異的 PCR 産物が得られる。

付記 7 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 mL

イーグル MEM

残 量

炭酸水素ナトリウムで pH を 7.0 ～ 7.4 に調整する。

必要最少量の抗生物質を加えてもよい。