

# 犬レプトスピラ病（カニコーラ・イクテロヘモラジー）不活化ワクチン（シード）

平成 30 年 9 月 11 日 (告示第 2046 号)一部改正

## 1 定義

シードロット規格に適合したレプトスピラ・カニコーラ（以下この項において「L・カニコーラ」という。）及びレプトスピラ・イクテロヘモラジー（以下この項において「L・イクテロヘモラジー」という。）の培養浮遊菌液を不活化し、濃縮したものを混合したワクチンである。

## 2 製法

### 2.1 製造用株

#### 2.1.1 L・カニコーラ

##### 2.1.1.1 名称

L・カニコーラ Ca-12-000 株又はこれと同等と認められた株

##### 2.1.1.2 性状

モルモット又はハムスターの腹腔内に注射すると増殖する。

抗 L・カニコーラ血清（付記 1）に対して特異的に凝集する。

##### 2.1.1.3 マスターシード菌

###### 2.1.1.3.1 作製、保存及び小分製品までの最高継代数

マスターシード菌は、適当と認められた培地で増殖させ、保存用の容器に分注する。

分注したマスターシード菌は、特定の製造番号又は製造記号を付し、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。

マスターシード菌について、3.1.1 の試験を行う。

マスターシード菌は、ワクチンの製造以外の目的で継代しない。マスターシード菌から小分製品までの最高継代数は、10 代以内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、その継代数以内とする。

##### 2.1.1.4 ワーキングシード菌

###### 2.1.1.4.1 増殖、継代及び保存

ワーキングシード菌は、適当と認められた培地で増殖及び継代する。

ワーキングシード菌は、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。

ワーキングシード菌について、3.1.2 の試験を行う。

##### 2.1.1.5 プロダクションシード菌

###### 2.1.1.5.1 増殖及び保存

プロダクションシード菌は、適当と認められた培地で増殖させる。

プロダクションシード菌を保存する場合は、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。

プロダクションシード菌を保存する場合は、3.1.3 の試験を行う。

#### 2.1.2 L・イクテロヘモラジー

##### 2.1.2.1 名称

L・イクテロヘモラジー 820K 株又はこれと同等と認められた株

##### 2.1.2.2 性状

モルモット又はハムスターの腹腔内に注射すると増殖する。

抗 L・イクテロヘモラジー血清（付記 2）に対して特異的に凝集する。

##### 2.1.2.3 マスターシード菌

#### 2.1.2.3.1 作製、保存及び小分製品までの最高継代数

マスターシード菌は、適当と認められた培地で増殖させ、保存用の容器に分注する。

分注したマスターシード菌は、特定の製造番号又は製造記号を付し、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。

マスターシード菌について、3.1.1の試験を行う。

マスターシード菌は、ワクチンの製造以外の目的で継代しない。マスターシード菌から小分製品までの最高継代数は、10代以内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、その継代数以内とする。

#### 2.1.2.4 ワーキングシード菌

##### 2.1.2.4.1 増殖、継代及び保存

ワーキングシード菌は、適当と認められた培地で増殖及び継代する。

ワーキングシード菌は、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。

ワーキングシード菌について、3.1.2の試験を行う。

#### 2.1.2.5 プロダクションシード菌

##### 2.1.2.5.1 増殖及び保存

プロダクションシード菌は、適当と認められた培地で増殖させる。

プロダクションシード菌を保存する場合は、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。

プロダクションシード菌を保存する場合は、3.1.3の試験を行う。

## 2.2 製造用材料

### 2.2.1 L・カニコーラ

#### 2.2.1.1 培地

製造に適当と認められた培地を用いる。

### 2.2.2 L・イクテロヘモラジー

#### 2.2.2.1 培地

製造に適当と認められた培地を用いる。

## 2.3 原液

### 2.3.1 L・カニコーラ

#### 2.3.1.1 培養

ワーキングシード菌又はプロダクションシード菌を培地に接種し、培養したものを培養菌液とする。

培養菌液について、3.2の試験を行う。

#### 2.3.1.2 不活化

適当と認められた方法で培養菌液を不活化したものを不活化菌液とする。

不活化菌液について、3.3の試験を行う。

#### 2.3.1.3 原液

適当と認められた方法で集菌し適当と認められた溶液に浮遊させたもの、又は適当と認められた方法で濃縮し適当と認められた溶液で洗浄したものを原液とする。

原液について、3.4の試験を行う。

### 2.3.2 L・イクテロヘモラジー

#### 2.3.2.1 培養

ワーキングシード菌又はプロダクションシード菌を培地に接種し、培養したものを培養菌液とする。

培養菌液について、3.2の試験を行う。

#### 2.3.2.2 不活化

適当と認められた方法で培養菌液を不活化したものを不活化菌液とする。

不活化菌液について、3.3 の試験を行う。

#### 2.3.2.3 原液

適当と認められた方法で集菌し適当と認められた溶液に浮遊させたもの、又は適当と認められた方法で濃縮し適当と認められた溶液で洗浄したものを原液とする。

原液について、3.4 の試験を行う。

#### 2.4 最終バルク

適当と認められた溶液で濃度調整した各原液を混合し、最終バルクとする。この場合、適当と認められた保存剤を添加してもよい。

#### 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、3.5 の試験を行う。

### 3 試験法

#### 3.1 製造用株の試験

##### 3.1.1 マスターシード菌の試験

###### 3.1.1.1 同定試験

シードロット規格の 1.4.2.4.1.1 を準用して試験するとき、適合しなければならない。

###### 3.1.1.2 夾雑菌否定試験

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。ただし、農林水産大臣が特に認めた場合には、その試験法とする。

##### 3.1.2 ワーキングシード菌の試験

###### 3.1.2.1 夾雑菌否定試験

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。ただし、農林水産大臣が特に認めた場合には、その試験法とする。

##### 3.1.3 プロダクションシード菌の試験

###### 3.1.3.1 夾雑菌否定試験

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 培養菌液の試験

##### 3.2.1 夾雑菌否定試験

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。ただし、農林水産大臣が特に認めた場合には、その試験法とする。

##### 3.2.2 総菌数試験

光電比色計又は菌数計算法によって菌数を測定する。検体中の総菌数は、1 mL 中  $10^5$  個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、その菌数とする。また、原液において抗原量測定試験を実施するものについては、この試験を行わなくてもよい。

#### 3.3 不活化菌液の試験

##### 3.3.1 不活化試験

原液において不活化試験を実施するものについては、この試験を行わなくてもよい。

###### 3.3.1.1 試験材料

###### 3.3.1.1.1 試料

検体を試料とする。

###### 3.3.1.1.2 培地

EMJH 培地（付記 3）又は適当と認められた培地を用いる。

###### 3.3.1.2 試験方法

試料 1 mL を 100mL の培地に接種し、27～31℃で 14 日間培養し、更に 100mL の培地に継代し、

両方の培地を 27～31℃で 14 日間培養する。

### 3.3.1.3 判定

いずれの培地でもレプトスピラの発育を認めてはならない。

## 3.4 原液の試験

### 3.4.1 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。

### 3.4.2 不活化試験

不活化菌液において不活化試験を実施するものについては、この試験を行わなくてもよい。

#### 3.4.2.1 試験材料

##### 3.4.2.1.1 試料

検体 5 mL 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。

##### 3.4.2.1.2 培地

コルトフ培地（付記 4）又は適当と認められた培地を用いる。

#### 3.4.2.2 試験方法

培地 20mL を入れた試験管 3 本に試料 0.5mL ずつを接種し、35～37℃で 6～8 日間培養し、各試験管から 1 白金耳を採取し、暗視野法で鏡検する。

#### 3.4.2.3 判定

レプトスピラの増殖を認めてはならない。

### 3.4.3 抗原量測定試験

#### 3.4.3.1 L・カニコーラ抗原量

##### 3.4.3.1.1 試験材料

##### 3.4.3.1.1.1 試料

検体を試料とする。

##### 3.4.3.1.2 試験方法

酵素抗体反応（以下この項において「ELISA」という。）により、試料中の ELISA 抗原量を求める。96 穴 ELISA 用プレートを用い、通常、11 列を抗原の最大結合量の測定に、12 列をブランクの測定に用いる。

L・カニコーラ固相化プレート（付記 5）の A 行及び 11 列を除く全ての穴に 1 w/v % スキムミルク加 0.05 % ポリソルベート 20 加 PBS（付記 6。以下この項において「PBST-SM」という。）を 100  $\mu$  L ずつ加える。PBST-SM でそれぞれ至適濃度に希釈した L・カニコーラ参照抗原（付記 7）、試料及び L・カニコーラ内部標準（付記 8）を、A 行の 1 から 10 列までの 2 穴ずつに 200  $\mu$  L ずつ加えた後、H 行まで 100  $\mu$  L ずつ送り、2 倍階段希釈する。また、11 列の全ての穴には、PBST-SM で至適濃度に希釈した最大結合量測定用 L・カニコーラ参照抗原（付記 9）を 100  $\mu$  L ずつ加え、37℃で 1 時間反応させる。0.05 % ポリソルベート 20 加 PBS（付記 10。以下この項において「PBST」という。）で洗浄後、PBST-SM で希釈した L・カニコーラ検出用抗体（付記 11）を各穴に 100  $\mu$  L ずつ加え、37℃で 1 時間反応させ、PBST で洗浄する。基質液（付記 12）を各穴に 100  $\mu$  L ずつ加え、遮光して室温で 10 分間反応させ、2 mol/L 硫酸溶液を各穴に 50  $\mu$  L ずつ加えて反応を停止させる。各穴の吸光度を波長 450nm で測定し、適当と認められた計算方法により試料中の ELISA 抗原量を求める。

##### 3.4.3.1.3 判定

試料 1 mL 中の抗原量は 30,000ELISA 単位以上でなければならない。この場合、内部標準で求められた抗原量は規定値を示さなければならない。試料の検量線の相関係数は 0.9 以上を示さなければならない。試料及び内部標準の検量線の傾きは参照抗原のそれに対して 0.8～1.25 の範囲にしなければならない。また、試料の各希釈段階における吸光度の変動係数は 20 % 以下でなければならない。

#### 3.4.3.2 L・イクテロヘモラジー抗原量

3.4.3.1 を準用して試験をするとき、試料 1 mL の抗原量は 3,000ELISA 単位以上でなければならない。ただし、試験には L・イクテロヘモラジー参照抗原（付記 13）、L・イクテロヘモラジー内部標準（付記 14）、L・イクテロヘモラジー固相化プレート（付記 15）、最大結合量測定用 L・イクテロヘモラジー参照抗原（付記 16）及び L・イクテロヘモラジー検出用抗体（付記 17）を用いる。

### 3.5 小分製品の試験

#### 3.5.1 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、固有の色調を有する均質な懸濁液でなければならない。異物及び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。

#### 3.5.2 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。

#### 3.5.3 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。

#### 3.5.4 チメロサル定量試験

チメロサル添加製剤については、一般試験法のチメロサ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。

#### 3.5.5 フェノール定量試験

フェノール添加製剤については、一般試験法のフェノール定量法を準用して試験するとき、フェノールの含有量は、0.2 w/v %以下でなければならない。

#### 3.5.6 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。

#### 3.5.7 安全試験

##### 3.5.7.1 試験材料

##### 3.5.7.1.1 接種材料

試験品を注射材料とする。

##### 3.5.7.1.2 試験動物

6 か月齢未満の犬を用いる。

##### 3.5.7.2 試験方法

注射材料 5 頭分ずつを用法に従ってそれぞれ 2 頭の試験動物に注射し、10 日間観察する。

##### 3.5.7.3 判定

観察期間中、異常を認めてはならない。

#### 3.5.8 力価試験

##### 3.5.8.1 試験材料

##### 3.5.8.1.1 注射材料

試験品を注射材料とする。

##### 3.5.8.1.2 試験動物

体重約 300g のモルモット又は体重 60 ~ 100g のハムスターを用いる。

##### 3.5.8.1.3 凝集反応用菌液

L・カニコーラ及び L・イクテロヘモラジーの生菌浮遊液を用いる。

##### 3.5.8.2 試験方法

注射材料 1 mL ずつを 10 匹の試験動物に 7 日間隔で 2 回皮下注射する。2 回注射後 14 日目に得られた各個体の血清について、凝集反応用菌液を用いて、溶菌凝集反応を行う。

##### 3.5.8.3 判定

それぞれの菌液に対し、80 %以上が 8 倍以上の凝集価を示さなければならない。

### 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 抗L・カニコーラ血清

L・カニコーラの不活化菌で免疫した兔又は体重300～350gのモルモットの血清で、凝集抗体価40倍以上のもの。

付記2 抗L・イクテロヘモラジー血清

L・イクテロヘモラジーの不活化菌で免疫した兔又は体重300～350gのモルモットの血清で、凝集抗体価40倍以上のもの。

付記3 EMJH 培地

1,000mL 中

リン酸水素ナトリウム二水和物	0.94 g
リン酸水素カリウム	0.27 g
塩化ナトリウム	0.9 g
塩化アンモニウム	0.23 g
塩酸サイアミン	0.004 g
87vol %グリセリン	0.09 g
牛血清アルブミン	10.0 g
ピルビン酸ナトリウム	0.09 g
硫酸亜鉛	0.004 g
塩化カルシウム	0.01 g
塩化マグネシウム	0.01 g
硫酸鉄(Ⅱ)七水和物	0.05 g
硫酸銅(Ⅱ)五水和物	0.0003g
ポリソルベート 80	1.25 g
ビタミン B <sub>12</sub>	0.0002g
水	残 量

220nm以下のフィルターでろ過滅菌する。

付記4 コルトフ培地

1,000 mL 中

ペプトン	0.8 g
塩化ナトリウム	1.4 g
炭酸水素ナトリウム	0.02 g
塩化カリウム	0.04 g
リン酸二水素カリウム	0.18 g
無水リン酸水素二ナトリウム	1.76 g
水	残 量

100℃で40分間加熱し、冷却した後ろ過し、pHを7.0～7.2に調整し、121℃で15分間高圧滅菌する。冷却した後、新鮮兔血清を8～10vol%となるように加える。

付記5 L・カニコーラ固相化プレート

L・カニコーラの防御エピトープを認識するモノクローナル抗体を炭酸緩衝液(付記18)で

至適濃度に調整したものを 96 穴 ELISA 用マイクロプレートの各穴に 150  $\mu$  L ずつ加え、2 ~ 8  $^{\circ}$ C で 16 時間固相化し、反応終了後抗体液を捨て、PBST-SM を各穴に 200  $\mu$  L ずつ加え 37  $^{\circ}$ C で 1 時間感作し、PBST で洗浄したもの。

付記 6 1 w/v % スキムミルク加 0.05 % ポリソルベート 20 加 PBS (PBST-SM)  
1,000mL 中  
スキムミルク 10 g  
PBST (付記 10) 1,000mL

付記 7 L・カニコーラ参照抗原  
L・カニコーラ培養菌液を不活化し、1 mL 中に不活化前生菌数が  $1 \times 10^9$  個を含むように調製したものを 1,000ELISA 単位を含む標準品として、ELISA 単位を測定したもの。- 15  $^{\circ}$ C 以下で保存する。

付記 8 L・カニコーラ内部標準  
L・カニコーラ参照抗原と同じ製造方法で作製し、PBST-SM で所定の ELISA 単位を含むように希釈して使用する。- 15  $^{\circ}$ C 以下で保存する。

付記 9 最大結合量測定用 L・カニコーラ参照抗原  
L・カニコーラ参照抗原を PBST-SM で至適濃度に希釈したもの。

付記 10 0.05 % ポリソルベート 20 加 PBS (PBST)  
1,000mL 中  
ポリソルベート 20 0.5mL  
PBS 1,000 mL

付記 11 L・カニコーラ検出用抗体  
L・カニコーラの防御エピトープを認識するモノクローナル抗体にペルオキシダーゼ標識を行ったもの。PBST-SM で希釈して使用する。- 15  $^{\circ}$ C 以下で保存する。

付記 12 基質液  
A 液  
10w/v % クエン酸溶液 3.2mL  
酢酸ナトリウム三水和物 13.1 g  
水 100 mL  
B 液  
テトラメチルベンチジン 2.36g  
ジメチルスルホキシド 100 mL  
使用時に A 液 : B 液 : 水を 1.5 : 0.2 : 13.3 の割合で混合する。あるいは適当な品質の市販品を用いてもよい。

付記 13 L・イクテロヘモラジー参照抗原  
L・イクテロヘモラジー培養菌液を不活化し、1 mL 中に不活化前生菌数が  $1 \times 10^9$  個を含むように調製したものを 1,000ELISA 単位を含む標準品として、ELISA 単位を測定したもの。- 15  $^{\circ}$ C 以下で保存する。

付記 14 L・イクテロヘモラジー内部標準

L・イクテロヘモラジー参照抗原と同じ製造方法で作製し、PBST-SM で所定の ELISA 単位を含むように希釈して使用する。－15℃以下で保存する。

付記 15 L・イクテロヘモラジー固相化プレート

L・イクテロヘモラジーの防御エピトープを認識するモノクローナル抗体を炭酸緩衝液で至適濃度に調整したものを 96 穴 ELISA プレートの各穴に 150  $\mu$  L ずつ加え、2～8℃で 16 時間固相化し、反応終了後抗体液を捨て、PBST-SM を各穴に 200  $\mu$  L ずつ加え 37℃で 1 時間感作し、PBST で洗浄したもの。

付記 16 最大結合量測定用 L・イクテロヘモラジー参照抗原

L・イクテロヘモラジー参照抗原を PBST-SM で至適濃度に希釈したもの。

付記 17 L・イクテロヘモラジー検出用抗体

L・イクテロヘモラジーの防御エピトープを認識するモノクローナル抗体にペルオキシダーゼ標識を行ったもの。PBST-SM で希釈して使用する。－15℃以下で保存する。

付記 18 炭酸緩衝液

1,000mL 中

炭酸ナトリウム

1.59g

炭酸水素ナトリウム

2.93g

精製水

残量

pH を 9.6 に調整する。