

改正後	改正前
<p>ワクチン（シードロット製剤）の部</p> <p>犬レプトスピラ病（カニココーラ・イクテロヘモラジー）不活化ワクチン（シード）</p> <p>1 定義 シードロット規格に適合したレプトスピラ・カニココーラ（以下この項において「L・カニココーラ」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。</p> <p>2 製法</p> <p>2.1 製造用株</p> <p>2.1.1 L・カニココーラ</p> <p>2.1.1.1 （略）</p> <p>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・カニココーラ血清（付記 1）に対して特異的に凝集する。</p> <p>2.1.1.3 マスターシード菌</p> <p>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℃以下又は凍結乾燥して 5℃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。<u>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。</u></p> <p>2.1.1.4 ・2.1.1.5 （略）</p> <p>2.1.2 L・イクテロヘモラジー</p> <p>2.1.2.1 （略）</p> <p>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。</p> <p>2.1.2.3 マスターシード菌</p> <p>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℃以下又は凍結乾燥して 5℃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。<u>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。</u></p> <p>2.1.2.4 ・2.1.2.5 （略）</p> <p>2.2 （略）</p>	<p>ワクチン（シードロット製剤）の部</p> <p>犬レプトスピラ病不活化ワクチン（シード）</p> <p>1 定義 シードロット規格に適合したレプトスピラ・カニココーラ（以下この項において「L・カニココーラ」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たワクチンである。</p> <p>2 製法</p> <p>2.1 製造用株</p> <p>2.1.1 L・カニココーラ</p> <p>2.1.1.1 （略）</p> <p>2.1.1.2 性状 モルモット及びハムスターの腹腔内に注射すると増殖する。 抗 L・カニココーラ血清（付記 1）に対して特異的に凝集する。</p> <p>2.1.1.3 マスターシード菌</p> <p>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℃以下又は凍結乾燥して 5℃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。</p> <p>2.1.1.4 ・2.1.1.5 （略）</p> <p>2.1.2 L・イクテロヘモラジー</p> <p>2.1.2.1 （略）</p> <p>2.1.2.2 性状 モルモット及び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。</p> <p>2.1.2.3 マスターシード菌</p> <p>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℃以下又は凍結乾燥して 5℃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。</p> <p>2.1.2.4 ・2.1.2.5 （略）</p> <p>2.2 （略）</p>

<p>2.3 原液</p> <p>2.3.1 L・カニコーラ</p> <p>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。 (略)</p> <p>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。</p> <p>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。</p> <p>2.3.2 L・イクテロヘモラジ</p> <p>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。 (略)</p> <p>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。</p> <p>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。</p> <p>2.4 (略)</p> <p>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。</p> <p>3 試験法</p> <p>3.1 製造用株の試験</p> <p>3.1.1 マスターシード菌の試験</p> <p>3.1.1.1 (略)</p> <p>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。</p> <p>3.1.2 ワーキングシード菌の試験</p> <p>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。</p> <p>3.1.3 (略)</p> <p>3.2 培養菌液の試験</p> <p>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。</p> <p>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</p>	<p>2.3 原液</p> <p>2.3.1 L・カニコーラ</p> <p>2.3.1.1 培養菌液 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。 (略)</p> <p>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、遠心して集菌し、適当と認められた溶液に浮遊させ、原液とする。 原液について、3.3の試験を行う。 (新設)</p> <p>2.3.2 L・イクテロヘモラジ</p> <p>2.3.2.1 培養菌液 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。 (略)</p> <p>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、遠心して集菌し、適当と認められた溶液に浮遊させ、原液とする。 原液について、3.3の試験を行う。 (新設)</p> <p>2.4 (略)</p> <p>2.5 小分製品 最終バルクを小分製品に分注し、小分製品とする。 小分製品について、3.4の試験を行う。</p> <p>3 試験法</p> <p>3.1 製造用株の試験</p> <p>3.1.1 マスターシード菌の試験</p> <p>3.1.1.1 (略)</p> <p>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。</p> <p>3.1.2 ワーキングシード菌の試験</p> <p>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。</p> <p>3.1.3 (略)</p> <p>3.2 培養菌液の試験</p> <p>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。</p> <p>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</p>
--	--

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 (略)

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 (略)

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・3.4.2.3 (略)

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 μ 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 μ L ずつ加えた後、H 行まで 100 μ 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 μ 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 μ 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 μ 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 μ 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 の範囲になければ

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。

(新設)

3.3 原液の試験

3.3.1 (略)

3.3.2 不活化試験

3.3.2.1 試験材料

3.3.2.1.1 (略)

3.3.2.1.2 培地

コルトフ培地（付記 3）又は適当と認められた培地を用いる。

3.3.2.2・3.3.2.3 (略)

(新設)

ばらない。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ル抗原量

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ル参照抗原(付記13)、L・イクテロヘモラジール内部標準(付記14)、L・イクテロヘモラジール固相化プレート(付記15)、最大結合量測定用L・イクテロヘモラジール参照抗原(付記16)及びL・イクテロヘモラジール検出用抗体(付記17)を用いる。

3.5 (略)

3.5.1 ~ 3.5.6 (略)

3.5.7 (略)

3.5.7.1 (略)

3.5.7.1.1 ~ 3.5.7.1.2 (略)

3.5.7.2 ~ 3.5.7.3 (略)

3.5.8 (略)

3.5.8.1 (略)

3.5.8.1.1 ~ 3.5.8.1.3 (略)

3.5.8.2 ~ 3.5.8.3 (略)

4 (略)

付記1・付記2 (略)

付記3 EMJH 増地

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 0.0045g

87vol %グリセリン 0.09 g

牛血清アルブミン 10.0 g

ビ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B₁₂ 0.0002g

水 残量

220nm以下のフィルターでろ過滅菌する。

付記4 (略)

付記5 L・カニコラ固相化プレート

L・カニコ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 μLずつ加え、2~8°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 μLずつ加え37°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 10.0 g

PBST (付記10) 1,000 mL

3.4 (略)

3.4.1 ~ 3.4.6 (略)

3.4.7 (略)

3.4.7.1 (略)

3.4.7.1.1 ~ 3.4.7.1.2 (略)

3.4.7.2 ~ 3.4.7.3 (略)

3.4.8 (略)

3.4.8.1 (略)

3.4.8.1.1 ~ 3.4.8.1.3 (略)

3.4.8.2 ~ 3.4.8.3 (略)

4 (略)

付記1・付記2 (略)

(新設)

付記3 (略)

(新設)

- 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 1×10^9 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℃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℃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PBS (PBST)

<u>1,000mL中</u>	
<u>ポリソルベート20</u>	<u>0.5mL</u>
<u>PBS</u>	<u>1,000 mL</u>
- 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℃以下で保存する。
- 付記12 基質液

<u>A液</u>	
<u>10w/v%クエン酸溶液</u>	<u>3.2mL</u>
<u>酢酸ナトリウム三水和物</u>	<u>13.1 g</u>
<u>水</u>	<u>100 mL</u>
<u>B液</u>	
<u>テトラメチルベンチジン</u>	<u>2.36g</u>
<u>ジメチルスルホキシド</u>	<u>100 mL</u>

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 1×10^9 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℃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 μ 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 μ 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пит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。