牛大腸菌性下痢症（K99保有全菌体・FY保有全菌体・31A保有全菌体・O78全菌体）（アジュバント加）不活化ワクチン

平成 21 年 11 月 12 日（告示第 1569 号）　一部改正

1 定義

線毛抗原 K99、FY 及び 31A を保有する大腸菌並びに O78 の大腸菌の培養菌液を不活化したものを混合し、アルミニウムゲル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 名称

大腸菌 IFFA77 040 15192 株、IFFA77 040 15193 株、IFFA81 040 15375 株、IFFA81 040 15374 株、IFFA80 040 15371 株及び IFFA75 040 1503 株又はこれと同等と認められた株

2.1.2 性状

各株は、次のような O 抗原及び線毛抗原を有する。

IFFA77 040 15192 株（O101:K99 $^{+}$,ST $^{+}$）

IFFA77 040 15193 株（O ９:K99 $^{+}$,ST $^{+}$）

IFFA81 040 15375 株（O117:FY $^{+}$）

IFFA81 040 15374 株（O ８:FY $^{+}$,31A $^{+}$）

IFFA80 040 15371 株（O15:31A $^{+}$）

IFFA75 040 15030 株（O78）

2.1.3 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、凍結乾燥して、５℃以下で保存する。

2.2 製造用材料

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（各大腸菌原液）

2.3.1 培養

種菌を培養したものを培養菌液とする。

培養菌液について、3.1 の試験を行う。

2.3.2 不活化

培養菌液にホルマリン又は適当と認められた不活化剤を加えて不活化後、ホルマリンを含むリン酸緩衝食塩液で遠心洗浄し、菌体濃度を同じ食塩液で調整する。更に 37 ℃で 10 日間放置したものを不活化菌液とする。

不活化菌液について 3.2 の試験を行う。

2.3.3 原液の調整

各不活化菌液を混合し、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

原液を撹拌した後、水酸化アルミニウムゲルアジュバント及びサポニンを添加し、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、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 培養菌液の試験

3.1.1 夾雑菌否定試験

3.1.1.1 試験方法

培養菌液をグラム染色し、鏡検する。

3.1.1.2 判定

特徴的な形態を示し、他の菌を認めてはならない。

3.1.2 型別試験

3.1.2.1 試験材料

3.1.2.1.1 試料

各培養菌液をホルマリンで不活化し、McFarland 混濁管 No.2 の濃度に調整したものを試料とする。

3.1.2.1.2 抗血清

参照陽性血清（付記１）を用いる。

3.1.2.2 試験方法

試料 0.025mL と抗血清 0.025mL を混合し、37 ℃で２時間更に常温で 18 時間静置し、管底像で判定する。

3.1.2.3 判定

各菌株は、特異な線毛抗原型を示さなければならない。

3.2 不活化菌液の試験

3.2.1 不活化確認試験

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 原液の試験

3.3.1 総菌数試験

3.3.1.1 試験方法

検体を適当と認められた希釈用液で適度に希釈し、分光光度計で濃度を測定する。

3.3.1.2 判定

標準検量線、濁度の測定値及び検体の希釈度から総菌数を算出するとき、検体中の総菌数は、１ mL 中３ $\times 10^9$個でなければならない。

3.4 小分製品の試験

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、固有の色調を有する均質な懸濁液でなければならず、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 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。

3.4.3 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。

3.4.4 ホルマリン定量試験

一般試験法のホルマリン定量法を準用して試験するとき、ホルマリン含有量は、1 mL 中 1.6mg 以下でなければならない。

3.4.5 アルミニウム定量試験

一般試験法のアルミニウム定量法を準用して試験するとき、アルミニウム含有量は、1mL 中 0.5 ～ 0.9mg でなければならない。

3.4.6 毒性限度確認試験

一般試験法の毒性限度確認試験法 1 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、試験品の注射量は 0.2mL とし、注射後 4 日目の体重を測定する。

3.4.7 O78 抗原定量試験

3.4.7.1 試験材料

試験品及び O78 抗血清（付記２）を用いる。

3.4.7.2 試験方法

3.4.7.2.1 吸収操作

試験品 5 mL をリン酸緩衝食塩液（以下「PBS」という。）で遠心洗浄した後、PBS を加え、BS 懸濁液とする。これを 121 ℃で 15 分間加熱処理後、PBS で２回遠心洗浄した沈殿を吸収用抗原とする。これに 0.1mL の抗血清を加え、混合した後、37 ℃で２時間更に４℃で 18 時間静置して吸収を行う。遠心上清中の残存 O78 抗体を測定する。

3.4.7.2.2 O 抗原凝集反応

Ｕ型マイクロプレートを用い、吸収処理した抗血清及び未吸収の抗血清について PBS で 0.05mL ずつの２倍階段希釈による希釈系列をそれぞれ２列ずつ作る。それぞれの希釈列に対して、等量の凝集反応用 O 抗原（付記３）を加える。振とう攪拌後、37 ℃で２時間更に４℃で 18 時間静置し、管底像で判定する。

3.4.7.3 判定

凝集が認められた血清の最高希釈倍数を抗体価とする。

吸収後の O78 抗体価は、未吸収のものの４分の１以下でなければならない。

3.4.8 力価試験

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

約 6 ～ 7 週齢のマウスを用いる。ただし、線毛抗原 31A に対する抗体測定については、C3H/He マウスを用いる。

3.4.8.1.3 凝集抗原

線毛凝集反応用抗原（付記４）を用いる。

3.4.8.2 試験方法

3.4.8.2.1 免疫方法

試験動物 10 匹を試験群、10 匹を対照群とする。注射材料 0.1mL を試験群の皮下に注射し、３週間後に両群から得られた各個体の血清について線毛凝集反応を行う。

3.4.8.2.2 線毛凝集反応

Ｕ型マイクロプレートを用い、対照群及び試験群の血清並びに参照陽性血清 0.025mL ずつについて２倍段階希釈による希釈列を作り、等量の線毛凝集反応用抗原を加える。振とう攪拌後、37 ℃で２時間更に常温で 18 時間静置し、管底像で判定する。

3.4.8.3 判定

凝集が認められた血清の最高希釈倍数を抗体価とする。

試験群では、線毛抗原 K99 及び 31A を含有する凝集反応用抗原に対して血清抗体価が 16 倍以上である個体数が 80 ％以上でなければならず、線毛抗原 FY を保有する凝集反応用抗原に対して血清抗体価が８倍以上である個体数が 80 ％以上でなければならい。この場合、対照群では、いずれの抗原に対してもすべて血清抗体価が４倍未満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　参照陽性血清

K99、FY 及び 31A を保有する大腸菌のホルマリン死菌浮遊液でそれぞれ兎を免疫して得られた抗血清で、線毛を加熱除去した各死菌体で吸収し、それぞれの抗血清に対応する線毛凝集反応用抗原に対する凝集価が 64 倍、それ以外の線毛凝集反応用抗原に対する凝集価が４倍以下になるように調整したものであり、小分けして凍結乾燥し、保存する。

付記２　O78 抗血清

大腸菌 TK 株で兎を免疫し、常法により吸収して調製したもの又はこれと同等と認められたものであり、PBS で希釈し、凝集価８倍に調整して用いる。

付記３　凝集反応用 O 抗原

大腸菌 O78 株を普通寒天培地で 37 ℃ 18 時間培養する。この菌体を PBS を用いて洗浄した後、0.01w/v％チメロサール加 PBS で McFarland 混濁管 No.2 の濃度に調整したものであり、４℃で保存する。

付記４　線毛凝集反応用抗原

K99 保有大腸菌（IFFA77 040 15192 株）、FY 保有大腸菌（IFFA81 040 15375 株）及び 31A 保有大腸菌（IFFA80 040 15371 株）、又はこれらと同等と認められた菌株を製造用ミンカ培地（付記５）で培養後、ホルマリンで不活化した菌浮遊液を凍結乾燥し、保存する。0.25vol ％ホルマリン加 PBS に浮遊して用いる。

なお、31A 保有大腸菌は、ホルマリン不活化菌浮遊液として保存し、用いることができる。

付記５　製造用ミンカ培地

1,000 mL 中

リン酸二水素カリウム	1.36 g
リン酸水素二ナトリウム十二水和物	10.1 g
カザミノ酸	1.0 g
ブドウ糖	1.0 g
塩類溶液*1	1.0mL
寒天	12.0 g
水	残　量

pH を 7.5 に調整し、121 ℃で 15 分間高圧滅菌する。

＊１：1,000mL 中

硫酸マグネシウム七水和物	10.0 g
塩化マンガン（Ⅱ）四水和物	1.0 g
塩化鉄（Ⅲ）六水和物	0.135g
塩化カルシウム二水和物	0.4 g

水　　残　量