牛ロタウイルス感染症３価・牛コロナウイルス感染症・牛大腸菌性下痢症（K99精製線毛抗原）混合（アジュバント加）不活化ワクチン

平成 21 年 7 月 1 日（告示第 861 号）　新規追加

1 定義

血清型のそれぞれ異なる３種類の牛ロタウイルスを培養細胞で増殖させて得たウイルス液、牛コロナウイルスを培養細胞で増殖させて得た感染細胞の可溶化抗原及び大腸菌精製線毛抗原 K99 をそれぞれ不活化し、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 牛ロタウイルス

2.1.1.1 名称

牛ロタウイルス Gunma 8701 株、Hyogo 9301 株及び Shimane 9501 株又は製造に適当と認められた３種類の株

2.1.1.2 性状

MA-104 細胞に接種すると単層細胞の剥離を特徴とする細胞変性効果（以下「CPE」という。）を伴って増殖し、その培養液は、モルモット赤血球を凝集する。

2.1.1.3 継代及び保存

原株及び種ウイルスは、MA-104 細胞又は適当と認められた細胞で継代する。

継代は、原株では３代以内、種ウイルスでは２代以内でなければならない。

原株及び種ウイルスは､凍結してー 70 ℃以下又は凍結乾燥して５℃以下で保存する。

2.1.2 牛コロナウイルス

2.1.2.1 名称

牛コロナウイルス No.66/H 株又はこれと同等と認められた株

2.1.2.2 性状

生後 3 日以内の乳のみマウスの脳内に接種すると、神経症状を呈し死亡する。

BK 細胞、HAL 細胞、ヒト直腸ガン由来株化（HRT-18）細胞及び BEK-1 細胞で合胞体形成を特徴とする CPE を伴って増殖する。

ラット、マウス、ハムスター及びニワトリ赤血球を凝集する。

2.1.2.3 継代及び保存

原株及び種ウイルスは、HAL 細胞又は適当と認められた細胞で継代する。

継代は、原株では３代以内、種ウイルスでは２代以内でなければならない。

原株及び種ウイルスは､凍結してー 70 ℃以下又は凍結乾燥して５℃以下で保存する。

2.1.3 大腸菌

2.1.3.1 名称

大腸菌 T-2 株又はこれと同等と認められた株

2.1.3.2 性状

ソイビーン・カゼイン・ダイジェスト液状培地で培養すると耐熱性エンテロトキシンを産生する。

2.1.3.3 継代及び保存

原株及び種菌は液体培地（付記１）及び寒天培地（付記２）で継代する。

継代は、原株では２代以内、種菌では３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２～５℃で保存する。

2.2 製造用材料

2.2.1 牛ロタウイルス

2.2.1.1 培養細胞

MA-104 細胞又は製造に適当と認められた培養細胞を用いる。

2.2.1.2 培養液

製造に適当と認められた培養液を用いる。

2.2.2 牛コロナウイルス

2.2.2.1 培養細胞

HAL 細胞又は製造に適当と認められた細胞を用いる。

2.2.2.2 培養液

製造に適当と認められた培養液を用いる。

2.2.3 大腸菌

2.2.3.1 培地

液体培地、寒天培地又は製造に適当と認められた培地を用いる。

2.3 原液

2.3.1 牛ロタウイルス原液

2.3.1.1 細胞の培養

１回に処理し、培養した細胞を個体別培養細胞とみなす。ウイルス接種前の培養細胞に異常を認めてはならない。

個体別培養細胞について、3.1 の試験を行う。

2.3.1.2 ウイルスの培養

各株の種ウイルスを培養細胞で培養し、ウイルスの増殖極期に個体別培養細胞ごとに採取した培養液の遠心上清を各株のウイルス浮遊液とする。

ウイルス浮遊液について、3.2.1 の試験を行う。

2.3.1.3 不活化

各株のウイルス浮遊液にホルマリンを 0.4vol ％となるよう加える方法又はその他適当と認められた方法により不活化し、各株の不活化ウイルス液とする。

不活化ウイルス液について、3.4 の試験を行う。

2.3.1.4 原液

各株ごとの不活化ウイルス液を混合し、各株の原液とする。

原液について 3.9 の試験を行う。

2.3.2 牛コロナウイルス原液

2.3.2.1 細胞の培養

１回に処理し、培養した細胞を個体別培養細胞とみなす。ウイルス接種前の培養細胞に異常を認めてはならない。

個体別培養細胞について、3.1 の試験を行う。

2.3.2.2 ウイルスの培養

種ウイルスを培養細胞で培養し、ウイルスの増殖極期に感染細胞と培養液を採取し、遠心した沈渣をウイルス感染細胞、上清をウイルス浮遊液とする。

ウイルス浮遊液について、3.2.2 の試験を行う。

2.3.2.3 可溶化

個体別ウイルス感染細胞を可溶化処理した後遠心した上清を可溶化抗原液とする。

可溶化抗原液について、3.5 の試験を行う。

2.3.2.4 不活化

可溶化抗原液から適当と認められた方法で可溶化剤を除去し、濃度調整したものにホルマリンを 0.05vol ％となるよう加える方法又はその他適当と認められた方法により不活化し、不活化可溶化抗原液とする。

不活化可溶化抗原液について、3.8 の試験を行う。

2.3.2.5 原液

不活化可溶化抗原液を混合し、原液とする。

原液について、3.9 の試験を行う。

2.3.3 大腸菌原液

2.3.3.1 培養

種菌を液体培地で培養したものを培養菌液とする。

培養菌液について、3.3 の試験を行う。

2.3.3.2 集菌

培養菌液を遠心し、その沈渣を線毛抽出用緩衝液（付記３）に浮遊し、濃厚菌液とする。

2.3.3.3 線毛の精製

濃厚菌液から適当と認められる方法で加熱抽出したものの遠心上清を抽出線毛抗原液とする。抽出線毛抗原液から塩析法により抗原画分を採取し、リン酸緩衝食塩液に浮遊し、透析後濃度調整したものを精製線毛抗原液とする。

精製線毛抗原液について、3.6 の試験を行う。

2.3.3.4 不活化

精製線毛抗原液にホルマリンを 0.1vol ％となるように加える方法又はその他適当と認められた方法により不活化し、不活化精製線毛抗原液とする。

不活化精製線毛抗原液について、3.7 の試験を行う。

2.3.3.5 原液

不活化精製線毛抗原液を混合し、原液とする。

原液について、3.9 の試験を行う。

2.4 最終バルク

各原液を混合し、適当と認められたアルミニウムゲルアジュバントを添加したものを最終バルクとする。

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、3.10 の試験を行う。

3 試験法

3.1 培養細胞の試験

個体別培養細胞の１％以上を対照培養細胞とし、これについて次の試験を行う。

3.1.1 培養観察

対照培養細胞を、ウイルスを接種することなく、ウイルスの培養と同じ条件で培養し、観察するとき、CPE を認めてはならない。

3.1.2 赤血球吸着試験

3.1.1 の観察最終日に培養液を除き、リン酸緩衝食塩液で細胞表面を２回洗浄後、２群に分け、生理食塩液で調整した 0.1vol ％のモルモット及びがちょうの赤血球浮遊液をそれぞれ重層し、60 分間静置後、赤血球吸着の有無を観察するとき、培養細胞に赤血球吸着を認めてはならない。

3.2 ウイルス浮遊液の試験

3.2.1 ウイルス含有量試験

3.2.1.1 ロタウイルス

3.2.1.1.1 試験材料

3.2.1.1.1.1 試料

検体をイーグル MEM で 10 倍階段希釈し、各段階の希釈液を試料とする。

3.2.1.1.1.2 培養細胞

MA-104 細胞を小試験管に１～３日間培養し、単層となったものを用いる。

3.2.1.1.2 試験方法

試料 0.1mL ずつをそれぞれ４本以上の培養細胞に接種し、37 ℃で 60 分間静置吸着させた後、牛ロタウイルス増殖用培養液（付記４）を 1.0mL ずつ加え、37 ℃で７日間回転培養し、観察する。

3.2.1.1.3 判定

培養細胞に CPE を認めたものを感染とみなし、$TCID_{50}$ を算出する。

検体のウイルス含有量は、１ mL 中 $10^{8.8}TCID_{50}$ 以上でなければならない。

3.2.2 赤血球凝集試験

3.2.2.1 コロナウイルス

3.2.2.1.1 試料

検体 0.4mL を 0.1w/v ％牛血清アルブミン（以下「BSA」という。）加リン酸緩衝食塩液で２倍階段希釈し、各段階の希釈液を試料とする。

3.2.2.1.2 試験方法

試料 0.4mL に１ vol ％になるように調整したマウス赤血球浮遊液をそれぞれ 0.2mL ずつ加え、よく混和後、常温に１～２時間静置し、赤血球凝集の有無を観察する。

3.2.2.1.3 判定

赤血球の凝集を認めた試料の最高希釈倍数で赤血球凝集価を表す。

検体の赤血球凝集価は、64 倍以上でなければならない。

3.3 培養菌液の試験

3.3.1 夾雑菌否定試験

3.3.1.1 試験材料

検体及び BCP 乳糖寒天培地（付記５）を用いる。

3.3.1.2 試験方法

検体１白金耳を直径９ cm のシャーレに固めた BCP 乳糖寒天培地５枚に塗抹し、37 ℃で 24 時間培養する。

3.3.1.3 判定

いずれの培地上にも黄色以外の集落を認めてはならない。

3.3.2 生菌数試験

3.3.2.1 試験材料

検体及び試験用培地 I（付記６）及び試験用培地 II（付記７）を用いる。

3.3.2.2 試験方法

検体を試験用培地 I を用いて、10 倍希釈系列にて 10^{-8} まで希釈し、10^{-7} 希釈液の 0.5mL と 10^{-8} 希釈液の 1.0mL とを、各々試験用培地 II の 20mL を用いて、直径９ cm のシャーレに混釈して固める。各希釈ごとに２枚ずつ作製し、37 ℃で 18 時間培養後、発育した集落数を数える。

3.3.2.3 判定

検体の希釈倍数、接種液量及び発現した集落数より検体１ mL 中の生菌数を計算するとき、3×10^{8} 個以上でなければならない。

3.4 不活化ウイルス液の試験

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

3.4.2.1 試験材料

3.4.2.1.1 試料

100 倍量以上のリン酸緩衝食塩液を用い、検体２ mL を４℃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 培養細胞

MA-104 細胞を小試験管に１～３日間培養し、単層となったものを用いる。

3.4.2.2 試験方法

試料の 0.1mL ずつを 10 本の小試験管の MA-104 培養細胞に接種し、37 ℃で 60 分間静置吸着させた後、試料を抜き取り、イーグル MEM で 1 回細胞を洗浄後、牛ロタウイルス増殖用培養液を 1.0mL ずつ加え、37 ℃で 7 日間回転培養する。培養細胞を凍結融解後、その培養液を次代に継代する。更に次代に継代し、同様の方法で培養し観察する。

3.4.2.3 判定

培養細胞に CPE を認めない場合、活性ウイルス陰性と判定する。

検体に活性ウイルスを認めてはならない。

3.5 可溶化抗原液の試験

3.5.1 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。

3.5.2 赤血球凝集試験

3.2.2 を準用して試験するとき、検体の赤血球凝集価は、14,120 倍以上でなければならない。

3.6 精製線毛抗原液の試験

3.6.1 抗原量の測定

3.6.1.1 試験材料

3.6.1.1.1 試料

検体をリン酸緩衝食塩液で 10 倍に希釈し、試料とする。

3.6.1.1.2 標準蛋白溶液

参照 BSA 液（付記８）を用いる。

3.6.1.2 試験方法

試料と参照 BSA 液の各濃度を 100 μ L ずつ別々の試験管に入れる。すべての試験管に反応液 A（付記 9）を 1.0mL ずつ入れ、混和後常温で 20 分間感作する。さらに、反応液 B（付記 10）を 1.0mL ずつ入れ、30 分～２時間感作したものについて、波長 550nm の吸光度を測定する。

3.6.1.3 判定

最小自乗法で Y を吸光度、X を蛋白量とする回帰直線 Y=aX+b を参照 BSA 液を用いて求める。試料の吸光度 Y を代入し、蛋白量 X を求め、検体の蛋白量としたとき蛋白量は 590 μ g/mL 以上でなければならない。

3.6.2 精製度確認試験

3.6.2.1 試験材料

3.6.2.1.1 試料

検体をリン酸緩衝食塩液で 100 μ g/mL になるように希釈し、試料とする。

3.6.2.1.2 試験方法

抗原捕捉用抗 K99 線毛抗原モノクローナル抗体（付記 11）を炭酸緩衝液（付記 12）で希釈し、酵素抗体法（以下「ELISA」という。）用マイクロプレート（付記 13）に 100 μ L ずつ加え、２～５℃で一夜静置しモノクローナル抗体を固相化する。このプレートを洗浄液（付記 14）で３回洗浄し、抗体希釈液（付記 15）を 250 μ L ずつ全穴に加え、37 ℃で 1 時間静置させた後、同様に３回洗浄する。次に試料及び参照抗原（付記 16）をそれぞれ８穴に 100 μ L ずつ加え、37 ℃で 60 分間反応させ、洗浄液で３回洗浄する。その後、抗 K99 線毛抗原陽性血清（付記 17）を全穴に 100 μ L ずつ加え、37 ℃で 60 分間反応させ、３回洗浄後、酵素標識抗体（付記 18）を全穴に 100

μ L ずつ加えて、37 ℃で 60 分間反応させ、３回洗浄する。次いで基質溶液（付記 19）を 100 μ L ずつ加え、遮光して 30 ℃で 30 分間反応させた後、１ mol/L 硫酸溶液を 50 μ L ずつ加えて反応を停止させる。各穴の吸光度を主波長 492nm、副波長 630nm で測定し、その差を ELISA 値とする。

3.6.2.1.3 判定

参照抗原の平均 ELISA 値が 0.6 ～ 1.0 のとき、試料の平均 ELISA 値は参照抗原の ELISA 値以上でなければならない。

3.6.3 エンドトキシン含量測定試験

3.6.3.1 試験材料

検体をリン酸緩衝食塩液で希釈し、試料とする。

3.6.3.2 試験方法

200 μ L の Et 反応液（付記 20）を加えた試験管に、エンドトキシンフリー蒸留水（ブランク）、エンドトキシン標準溶液（付記 21）又は試料 10 μ L をそれぞれ加え、混和する。直ちに 37 ℃で 30 分間反応させ、反応終了後氷水浴槽に移し、0.8mol/L 酢酸 0.4mL を加え反応を停止させる。波長 405nm の吸光度を測定する。

3.6.3.3 判定

検体のエンドトキシン濃度を以下の計算式を用いて算出するとき、8,820ng/mL 以下でなければならない。

$$C = Et \times \frac{\Delta E\ (Sa)}{\Delta E\ (St)} \times df$$

C：検体のエンドトキシン濃度（pg/mL）
Et：エンドトキシン標準液濃度（pg/mL）
Δ E（Sa）：試料の吸光度－ブランクの吸光度
Δ E（St）：標準溶液の吸光度－ブランクの吸光度
df：検体の希釈倍数

3.7 不活化精製線毛抗原液の試験

3.7.1 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。

3.8 不活化可溶化抗原液の試験

3.8.1 不活化試験

3.8.1.1 試験材料

3.8.1.1.1.試料

100 倍量以上のリン酸緩衝食塩液を用い、検体２ mL を４℃で一夜透析し、不活化剤を除去したものを試料とする。

3.8.1.1.2 培養細胞

HAL 細胞を小試験管に１～２日間培養し、単層となったものを用いる。

3.8.1.2 試験方法

試料の 0.1mL ずつを 10 本の小試験管の HAL 細胞に接種し、37 ℃で 60 分間吸着させた後、試料を抜き取り、イーグル MEM で１回細胞を洗浄後、牛コロナウイルス増殖用培養液（付記 22）を 1.0mL ずつ加え、37 ℃で７日間回転培養し、観察する。

3.8.1.3 判定

培養細胞に CPE を認めない場合、活性ウイルス陰性と判定する。

検体に活性ウイルスを認めてはならない。

3.8.2 赤血球凝集試験

3.2.2 を準用して試験するとき、検体の赤血球凝集価は、14,120 倍以上でなければならない。

3.9 原液の試験

3.9.1 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。

3.10 小分製品の試験

3.10.1 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。

3.10.2 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。

3.10.3 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。

3.10.4 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、ホルマリンの含有量は、0.23vol ％以下でなければならない。

3.10.5 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、アルミニウムの含有量は、１ mL 中１ mg 以下でなければならない。

3.10.6 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、注射量は 0.2mL とする。

3.10.7 力価試験

3.10.7.1 牛ロタウイルス

3.10.7.1.1 試験材料

3.10.7.1.1.1 注射材料

試験品を注射材料とする。

3.10.7.1.1.2 試験動物

約 4 週齢のマウスを用いる。

3.10.7.1.1.3 中和試験用ウイルス

MA-104 細胞で増殖させた牛ロタウイルス Gunma 8701 株、Hyogo 9301 株及び Shimane 9501 株を用いる。

3.10.7.1.1.4 培養細胞

MA-104 細胞を小試験管で１～３日間培養し、単層を形成させたものを用いる。

3.10.7.1.2 試験方法

注射材料 0.5mL ずつを 20 匹の試験動物の腹腔内に３週間隔で２回注射し、２回目の注射後、14 日目に得られた血清について中和試験を行う。

マウス血清は、任意に４匹ずつプールし、５プールを用いる。

被検血清を非働化した後、10 倍から２倍階段希釈する。各希釈血清 0.5mL と 0.1mL 中に約 200$TCID_{50}$ のウイルスを含む中和試験用ウイルス液 0.5mL とを混合し、37 ℃で 60 分間処理する。この各混合液 0.1mL ずつを４本の培養細胞に接種し、37 ℃で 60 分間静置吸着させた後、接種した混合液を除き、イーグル MEM で１回細胞を洗浄後、牛ロタウイルス増殖用培養液を 1.0mL ずつ加え、37 ℃で７日間回転培養し、観察する。

3.10.7.1.3 判定

培養細胞の２本以上に 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。

中和抗体価 80 倍以上を中和抗体陽性とする。

プール血清の中和抗体陽性率は、それぞれのウイルスに対し 80 ％以上でなければならない。

3.10.7.2 牛コロナウイルス

3.10.7.2.1 赤血球凝集抗原

牛コロナウイルス赤血球凝集抗原（付記 23）を用いる。

3.10.7.2.2 試験方法

3.10.7.1.2 の血清について赤血球凝集抑制試験を行う。

被検血清 0.1mL に 0.1w/v ％ BSA 加リン酸緩衝食塩液 0.4mL 及び 25w/v ％カオリン加生理食塩液（付記 24）0.5mL を加え、常温で 20 分間処理した後、1,700*G* で 10 分間遠心し、その上清 0.2mL を 0.1w/v ％ BSA 加リン酸緩衝食塩液で２倍階段希釈する。各希釈血清 0.2mL に４単位の赤血球凝集抗原 0.2mL を加え、常温で 60 分間処理した後、1.0vol ％マウス赤血球浮遊液 0.2mL を加え、１～２時間静置し、観察する。

3.10.7.2.3 判定

赤血球凝集を阻止した血清の最高希釈倍数を赤血球凝集抑制抗体価とする。

赤血球凝集抑制抗体価 160 倍以上を赤血球凝集抑制抗体陽性とする。

プール血清の赤血球凝集抑制抗体陽性率は、80 ％以上でなければならない。

3.10.7.3 大腸菌

3.10.7.3.1 試験方法

3.10.7.1.2 の血清について ELISA を行う。

大腸菌 K99ELISA 抗体価測定用抗原（付記 25）を炭酸緩衝液で希釈し、ELISA 用マイクロプレートに 100 μ L ずつ加え、２～５℃で一夜静置し抗原を固相化する。このプレートを洗浄液で３回洗浄し、抗体希釈液を１穴に 250 μ L ずつ全穴に加え、37 ℃で１時間静置させた後、同様に３回洗浄する。次に抗体希釈液で 100 倍から 12,800 倍まで２倍階段希釈を行ったプール血清、参照陽性血清（付記 26）及び参照陰性血清（付記 27）をそれぞれ１列に 100 μ L ずつ加え、37 ℃で 60 分間反応させ、洗浄液で３回洗浄する。その後、抗体希釈液で希釈した酵素標識抗体を全穴に 100 μ L ずつ加えて 37 ℃で 60 分間反応させ、３回洗浄する。次いで基質溶液を 100 μ L ずつ加え、遮光して 30 ℃で 30 分間反応させた後、１ mol/L 硫酸溶液を 50 μ L ずつ加えて反応を停止させる。各穴の吸光度を主波長 492nm、副波長 630nm で測定し、その差を ELISA 値とする。

3.10.7.3.2 判定

ELISA 値が、0.5 以上を示す血清の最高希釈倍数を抗体価とする。参照陽性血清が 800 倍から 3,200 倍、参照陰性血清が 100 倍未満の抗体価を示すとき、プール血清の ELISA 抗体価 1,600 倍以上を陽性とする。

プール血清の 80 ％以上が ELISA 抗体陽性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　液体培地

1,000mL 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	20.3　g
カゼイン製ペプトン	10.0　g
ブドウ糖	1.0　g
酵母エキス	1.0　g
塩化ナトリウム	5.0　g
塩類溶液*	1.0 mL
水	残　量

pH を 7.2 ～ 7.4 に調整し、118 ℃で 20 分間高圧滅菌する。

＊ 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	0.135 g
塩化カルシウム二水和物	0.4 g
水	残 量

付記２　寒天培地

1,000mL 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	20.3 g
カゼイン製ペプトン	10.0 g
酵母エキス	1.0 g
塩化ナトリウム	5.0 g
塩類溶液*	1.0 mL
寒天	12.0 g
水	残 量

118 ℃で 15 分間高圧滅菌する。

＊ 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	0.135 g
塩化カルシウム二水和物	0.4 g
水	残 量

付記３　線毛抽出用緩衝液

1,000mL 中

リン酸二水素カリウム	0.2 g
リン酸水素二ナトリウム十二水和物	58.44 g
塩化ナトリウム	8.0 g
塩化カリウム	0.2 g
水	残 量

pH を 7.0 ～ 7.4 に調整し、121 ℃で 15 分間高圧滅菌する。

付記４　牛ロタ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
トリプシン	1 mg
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　BCP 乳糖寒天培地

1,000mL 中

バクトビーフ･イクストラクト　3.0　g
バクトペプトン　5.0　g
ラクトース　10.0　g
細菌用寒天　10.0　g
ブロモクレゾールパープル　0.025 g
水　残　量
pH を 6.8 ～ 7.0 に調整し、121 ℃で 15 分間高圧滅菌する。

付記６　試験用培地 I
1,000mL 中
カゼイン製ペプトン　17.0　g
バクトソイトン　3.0　g
ブドウ糖　2.5　g
リン酸水素二カリウム　2.0　g
塩化ナトリウム　5.0　g
水　残　量
pH を 7.1 ～ 7.5 に調整し、121 ℃で 15 分間高圧滅菌する。

付記７　試験用培地 II
1,000mL 中
カゼイン製ペプトン　15.0　g
バクトソイトン　5.0　g
塩化ナトリウム　5.0　g
寒天　12.0　g
水　残　量
pH を 7.1 ～ 7.5 に調整し、121 ℃で 20 分間高圧滅菌する。

付記８　参照 BSA 液
BSA を水で 1 mg/mL となるように作製した後、下表に準じて調整したものを各濃度の参照 BSA 液とする。

BSA 濃度	量比	
	1 mg/mL BSA	PBS
0	0	1,000
25	25	975
50	50	950
100	100	900
200	200	800
400	400	600

付記９　反応液 A
a　1,000mL 中

炭酸ナトリウム	20.0　g
水酸化ナトリウム	4.0　g
水	残　量

b　100mL 中

硫酸銅六水和物	0.5　g
酒石酸カリウム	1.0　g
水	残　量

使用直前に、a：b = 50：1 の割合で混合したものを反応液 A とする。

付記 10　反応液 B

フェノール試薬２ mol/L を水で２倍に希釈する。

付記 11　抗原捕捉用抗 K99 線毛抗原モノクローナル抗体

1 性状

K99 抗原を発現している大腸菌を特異的に凝集する。K99 線毛抗原を発現している大腸菌から加熱処理及び硫酸アンモニウム塩析法により精製した線毛を抗原として、ウェスタンブロッティング法を行うと、約 17kDa の位置に特異的なバンドを認める。

2 作製方法

K99 抗原を保有する大腸菌 T-2 株（10^9 個/mL 以上を含有）をマウスに３週間隔で２回腹腔内に注射し、脾細胞を得る。その細胞とミエローマ細胞との融合細胞のうち、抗 K99 線毛抗原モノクローナル抗体を産生している細胞を、K99 精製線毛を抗原とした ELISA 法により選択後、クローニングを行う。抗体産生細胞の培養液を抗原捕捉用抗 K99 線毛抗原モノクローナル抗体とする。

3 規格

参照抗原、抗 K99 線毛抗原陽性血清を用いて 3.6.2 に準じた方法で ELISA を実施し、吸光度値が 0.6 ～ 1.0 になるように炭酸緩衝液で希釈して使用する。

付記 12　炭酸緩衝液

1,000mL 中

炭酸ナトリウム	1.59　g
炭酸水素ナトリウム	2.93　g
水	残　量

pH を 9.6 に調整する。

付記 13　ELISA 用マイクロプレート

U 字型 96 穴プレートを用いる。

付記 14　洗浄液

1,000mL 中

塩化ナトリウム	8.00　g
塩化カリウム	0.20　g
リン酸二水素カリウム	0.20　g
リン酸水素二ナトリウム十二水和物	2.90　g
ポリソルベート 20	0.50 mL
水	残　量

付記 15　抗体希釈液

BSA ２ g を洗浄液 100mL で使用直前に溶解したもの

付記 16　参照抗原

液体培地で増殖させた大腸菌 T-2 株から加熱処理及び硫酸アンモニウム塩析法により精製した K99 線毛抗原で、SDS ポリアクリルアミドゲル電気泳動により分析した場合、約 17kDa の単一なバンドを認める。リン酸緩衝食塩液で 1mg/mL になるように調整した抗原液を注射材料とし、3.10.7.3 に準じた方法でマウスへの注射及び大腸菌 ELISA 抗体価の測定を行うと、ELISA 抗体価は 800 倍以上を示す。

抗原捕捉用抗 K99 線毛抗原モノクローナル抗体及び抗 K99 線毛抗原陽性血清を用いて 3.6.2 に準じた方法で ELISA を実施し、ELISA 値が 0.6 ～ 1.0 になるように調整して使用する。

付記 17　抗 K99 線毛抗原陽性血清

液体培地で増殖させた大腸菌 T-2 株から加熱処理及び硫酸アンモニウム塩析法により精製した K99 線毛抗原を 1 mg/mL になるようにリン酸緩衝食塩液で調整し、その抗原とリン酸アルミニウムゲルを 85：15 の割合で混合する。その 0.5mL を体重約 350g のモルモットの皮下に３週間隔で２回注射し、その２週間後に得られた血清である。

抗原捕捉用抗 K99 線毛抗原モノクローナル抗体及び参照抗原を用いて 3.6.2 に準じた方法で ELISA を実施し、ELISA 値が 0.6 ～ 1.0 になるように調整して使用する。

付記 18　酵素標識抗体

西洋ワサビペルオキシダーゼ標識抗モルモット IgG を用い、抗原捕捉用抗 K99 線毛抗原モノクローナル抗体及び参照抗原を用いて 3.6.2 に準じた方法で ELISA を実施し、抗 K99 線毛抗原陽性血清の吸光度値が 0.6 ～ 1.0 になるように調整して使用する。

付記 19　基質溶液

オルトフェニレンジアミン二塩酸塩 13mg をリン酸クエン酸緩衝液* 32.5mL に溶解し、遮光する。使用直前に過酸化水素水を 13 μ L 添加する。

＊　1,000mL 中

無水クエン酸	4.67　g
リン酸水素二ナトリウム十二水和物	19.95　g
水	残　量

pH を 5.0 に調整する。

付記 20　Et 反応液

カブトガニライセートと発色合成基質をバイアル瓶に分注し、乾燥させたもので、エンドトキシンフリー蒸留水 100 μ L 及び 0.2mol/L Tris-HCl * 100 μ L を加えて使用する。

＊　1,000mL 中

トリス（ヒドロキシメチル）アミノメタン	10.60　g
トリス（ヒドロキシメチル）アミノメタン塩酸塩	17.76　g
水	残　量

調製後の pH は 8.0 である。

付記 21　エンドトキシン標準溶液

E.coli O111：B4 由来のエンドトキシンで、そのエンドトキシン濃度は 100 ～ 300pg/mL の範囲である。

付記 22　牛コロナ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 7.2 ～ 7.6 に調整する。

牛胎子血清は、牛コロナウイルスに対する中和抗体陰性のものを用いる。

必要最少量の抗生物質を加えてもよい。

付記 23　牛コロナウイルス赤血球凝集抗原

牛コロナウイルス No.66/H 株を HAL 細胞で増殖させて得た培養上清又は適当と認められた株を用いて調製した赤血球凝集抗原で、赤血球凝集価 64 倍以上のもの

付記 24　25w/v ％カオリン加生理食塩液

1,000mL 中

カオリン	250　g
塩化ナトリウム	8.75 g
水	残　量

１ mol/L 水酸化ナトリウム溶液で pH を 7.2 ～ 7.4 に調整する。

付記 25　大腸菌 K99ELISA 抗体価測定用抗原

液体培地で増殖させた大腸菌 T-2 株から熱抽出、硫酸アンモニウム塩析及び陽イオン交換クロマトグラフィーにより精製した K99 線毛抗原で、SDS ポリアクリルアミドゲル電気泳動により分析するとき、約 17kDa の単一なバンドを認めるもの

付記 26　参照陽性血清

液体培地で増殖させた大腸菌 T-2 株から加熱処理及び硫酸アンモニウム塩析法により精製した K99 線毛抗原を 118 μ g/mL になるようにリン酸緩衝食塩液で調整し、その抗原とリン酸アルミニウムゲルを 85：15 の割合で混合する。その 0.5 mL を約４週齢のマウスの腹腔内に３週間隔で２回注射し、その２週間後に得られた血清である。

大腸菌 K99　ELISA 抗体価測定用抗原を用いて 3.10.7.3 に準じた方法で ELISA を実施するき、ELISA 抗体価は 800 倍から 3,200 倍を示す。

付記 27　参照陰性血清

非免疫マウスの血清で、大腸菌 K99　ELISA 抗体価測定用抗原を用いて 3.10.7.3 に準じた方法で ELISA を実施するとき、ELISA 抗体価は 100 倍未満を示す。