

牛大腸菌性下痢症（K99 保有全菌体）（アジュバント加）不活化ワクチン

1 定義

線毛抗原 K99 を保有する大腸菌を培養し不活化後、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 NADC1471 株又はこれと同等と認められた株。

2.1.2 性状

感受性の新生子牛に経口投与した場合、下痢を発症させる。血清学的性状は O101、K -、K99、F41、H -、産生エンテロトキシンは Sta である。

2.1.3 継代及び保存

原株及び種菌は、液体培地（付記 1）又は適当と認められた培地で継代する。

継代は、原株では特に承認された継代数以内でなければならず、種菌では 10 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 年以下で保存する。

2.2 製造用材料

2.2.1 培地

製造用液体培地（付記 2）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 培養

種菌を 5 % 羊血液寒天培地で培養したものを製造用培地に接種し培養したものを培養菌とする。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、リン酸緩衝食塩液で遠心洗浄し、適量のリン酸緩衝食塩液に再浮遊させ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

不活化菌液に水酸化アルミニウムゲルアジュバントを添加し、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

原液を攪拌した後、適当と認められた保存剤を添加し、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

培養菌液 10mL を低温下で遠心分離により集菌し、2 mL の生理食塩液に浮遊して試料とする。

3.1.2.1.2 抗血清

大腸菌 K99 血清（付記 3）を用いる。

3.1.2.2 試験方法

試料 0.03mL と抗 K99 血清 0.03mL をスライド上で混合し、急速凝集反応を行う。

3.1.2.3 判定

30 秒以内に凝集しなければならない。

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 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。

3.3.2 総菌数試験

3.3.2.1 試験方法

検体の菌数を Petroff-Hausen の菌数計算板で測定する。

3.3.2.2 判定

菌数は 1 mL あたり 1×10^{10} 個以上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ない。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、0.5vol% 以下でなければならない。

3.4.5 チメロサル定量試験

チメロサル添加製剤について、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。

3.4.6 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、1 mL 中 1.0 ~ 1.6mg でなければならない。

3.4.7 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。

3.4.8 安全試験

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

分娩予定 3 ~ 6 週間前の健康な牛を用いる。

3.4.8.2 試験方法

注射材料 10mL を試験動物 1 頭の臀部筋肉内に注射し、7 日間観察する。

3.4.8.3 判定

試験期間中に流死産及び早産を認めてはならない。

3.4.9 力価試験

3.4.9.1 試験材料

3.4.9.1.1 注射材料

試験品を注射材料とする。

3.4.9.1.2 試験動物

約 6 ~ 7 週齢のマウスを用いる。

3.4.9.1.3 凝集抗原

大腸菌 K99 血清に対する間接赤血球凝集抗原（付記 4）を用いる。

3.4.9.2 試験方法

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 週間後に試験群及び対照群から得られた各個体の血清について、間接赤血球凝集試験を行い、K99 に対する抗体価を測定する。

3.4.9.3 判定

赤血球凝集が認められた血清の最高希釈倍数を抗体価とする。

試験群の抗体価は、80 % 以上が 16 倍以上を示さなければならない。この場合、対照群では、すべて 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、1 年間とする。ただし、特に承認されたものは、その期間とする。

付記 1 液体培地

1,000mL 中

塩化アンモニウム	2.0 g
リン酸二水素ナトリウム二水和物	4.5 g
無水リン酸水素二ナトリウム	17.0 g
硫酸マグネシウム七水和物	0.05 g
硫酸鉄（ ）七水和物	5.0mg
ブドウ糖	5.0 g
水	残 量

pH を 7.2 ~ 7.4 に調整し、121 30 分間高圧滅菌する。

は濃厚溶液を作製後、ろ過滅菌し、所定量を添加する。

付記 2 製造用培地

1,000mL 中

塩化アンモニウム	2.0 g
リン酸二水素ナトリウム二水和物	4.5 g
無水リン酸水素二ナトリウム	17.0 g
硫酸マグネシウム七水和物	0.05 g

硫酸鉄（ ）七水和物	5.0mg
ブドウ糖	1.5 g
無水塩化カルシウム	1.1mg
硫酸亜鉛七水和物	1.61 g
塩化マンガン	1.26 g
水	残 量

pH を 7.4 に調整し、121 30 分間高圧滅菌する。

は濃厚溶液を作製後、ろ過滅菌し、所定量を添加する。

付記 3 大腸菌 K99 血清

K99 線毛保有大腸菌 K-12 株で兔を免疫し、得られた抗血清を非働化後、加熱死菌体で吸収したもので、間接赤血球凝集反応で抗体価が 128 倍を示すように調整したもの

付記 4 間接赤血球凝集抗原

アルデヒド固定羊赤血球を最適希釈濃度の K99 抗原で処理し、大腸菌 K99 血清に対する間接赤血球凝集価が規定の範囲を示すように調整したもの