

豚大腸菌性下痢症（K88保有全菌体・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 K88 及び K99 を保有する大腸菌の培養菌液をそれぞれ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 K88 線毛抗原保有大腸菌

2.1.1.1 名称

毒素原性大腸菌 KY-4 株又はこれと同等と認められた株

2.1.1.2 性状

易熱性エンテロトキシンを産生する。0～3日齢哺乳豚に経口接種すると下痢を発症させる。

2.1.1.3 継代及び保存

原株及び種菌は、液体培地（付記1）、寒天培地（付記2）又は適当と認められた培地で継代する。

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5年以下で保存する。

2.1.2 K99 線毛抗原保有大腸菌

2.1.2.1 名称

毒素原性大腸菌 T-2 株又はこれと同等と認められた株

2.1.2.2 性状

耐熱性エンテロトキシンを産生する。0～3日齢哺乳豚に経口接種すると下痢を発症させる。

2.1.2.3 継代及び保存

原株及び種菌は液体培地又は寒天培地で継代する。

原株の継代は2代以内、種菌の継代は3代以内とする。

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

液体培地その他製造に適当と認められた寒天培地を用いる。

2.3 原液（各大腸菌原液）

2.3.1 培養

それぞれの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、3.1の試験を行う。

2.3.2 不活化

培養菌液にホルマリンを加え、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、3.2の試験を行う。

2.3.3 原液（各大腸菌原液）

不活化菌液を遠心し、リン酸緩衝食塩液で再浮遊させ、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

原液を混合し、濃度調整し、アルミニウムゲルアジュバントを添加し、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、3.4 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 試験材料

検体及び BCP 乳糖寒天培地（付記 3）を用いる。

3.1.1.2 試験方法

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

3.1.1.3 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。

3.1.2 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 K88 血清（付記 4）及び大腸菌 K99 血清（付記 5）を用いる。

3.1.2.2 試験方法

KY-4 株由来の試料 0.03mL と大腸菌 K88 血清 0.03mL、T-2 株由来の試料 0.03mL と大腸菌 K99 血清 0.03mL を各々スライドグラス上で混合し、急速凝集反応を行う。

3.1.2.3 判定

両反応とも試料は各々の抗血清で 30 秒以内に凝集しなければならない。

3.1.3 生菌数試験

3.1.3.1 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）又はこれらと同等の発育の得られる培地を用いる。

3.1.3.2 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 0.5 mL と 10^{-8} 希釈液の 1.0 mL とを、各々試験用培地 II の 20 mL を用いて、直径 9 cm のシャーレに混釈して固める。各希釈毎に 2 枚ずつ作製し、36℃ で 16 時間培養後、発育した集落を計測する。

3.1.3.3 判定

試料の希釈倍数、接種液量、及び発現した集落より検体 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。

3.2 不活化菌液の試験

3.2.1 不活化試験

3.2.1.1 試験材料

検体及び試験用培地 I もしくはこれと同等の発育の得られる培地を用いる。

3.2.1.2 試験方法

試験用培地を 20 mL ずつ分注した試験管 4 本に、検体を 0.5 mL ずつ接種し、37℃ で 48 時間培養観察する。

3.2.1.3 判定

いずれの試験管も菌の発育による混濁を認めてはならない。

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。

3.4 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 チメロサル定量試験

チメロサル添加剤については、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。

3.4.5 ホルマリン定量試験

ホルマリン添加剤については、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、0.3vol%以下でなければならない。

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、1mL 中のアルミニウムの含有量は、0.65 ~ 1.00 mg の範囲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。

ただし、試験品の注射量は 0.2mL とし、体重測定は 4 日目に行うものとする。

3.4.8 力価試験

3.4.8.1 試験材料

3.4.8.1.1 注射材料

試験品をリン酸緩衝食塩液で 10 倍に希釈したものを注射材料とする。

3.4.8.1.2 試験動物

約 5 週齢のマウスを用いる。

3.4.8.1.3 酵素抗体反应用抗原

精製 K88 抗原（付記 8）及び精製 K99 抗原（付記 9）を用いる。

3.4.8.2 試験方法

試験動物 30 匹以上を試験群、30 匹以上を対照群とする。注射材料 0.5mL ずつを 2 週間隔で 2 回、試験群の筋肉内に注射する。第 2 回目の注射後 14 日目に両群から得られた各個体の血清について酵素抗体反応（以下「ELISA」という。）により抗体価を測定する。

試験群と対照群の血清、参照陽性血清（付記 10）及び参照陰性血清（付記 11）をポリソルベート 20 添加リン酸緩衝食塩液（付記 12。以下「ポリソルベート PBS」という。）で 100 倍に希釈したものを抗原吸着プレート（付記 13）の穴に 0.1mL ずつ加え、30℃ で 1 時間反応させた後、ポリソルベート PBS でよく洗浄する。各穴にペルオキシダーゼ標識抗マウス IgG 液（付記 14）を 0.1mL 加え、37℃ で 1 時間反応させ、ポリソルベート PBS でよく洗浄する。その後、基質液（付記 15）を各穴に 0.1mL 加え、遮光して常温で 30 分間反応させた後、1 mol/L 硫酸溶液を各穴に 0.05mL ずつ加えて反応を停止させる。各穴の吸光度を主波長 492nm 及び副波長 630nm で測定、その差の平均値を吸光度値とする。

3.4.8.3 判定

参照陽性血清の吸光度を OD_p、参照陰性血清の吸光度を OD_n、試験群の血清の吸光度を OD_v、対照群の血清の吸光度を OD_c とし、吸光度比を算出する。

試験群の血清の 70 % 以上が OD_v / OD_p > 1 でなければならず、かつ対照群の血清の 70 % 以上が OD_c / OD_n > 2 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

リン酸二水素カリウム	13.6 g
無水リン酸水素二ナトリウム	20.3 g
トリプチケース・ペプトン	10.0 g
ブドウ糖	1.0 g
イースト・エキストラクト	1.0 g
塩化ナトリウム	5.0 g
微量塩類溶液* ¹	1.0 mL
水	残 量

pH を 7.2 ~ 7.4 に調整して、118 20 分間高圧滅菌する。

* 1: 塩化マグネシウム六水和物	10.0 g
塩化マンガン()四水和物	1.0 g
塩化鉄()六水和物	0.135g
塩化カルシウム二水和物	0.4 g
水	1000 mL

付記 2 寒天培地

1,000mL 中

リン酸二水素カリウム	1.36 g
無水リン酸水素二ナトリウム	20.3 g
塩化ナトリウム	5.0 g
トリプチケース・ペプトン	10.0 g
イースト・エキストラクト	1.0 g
微量塩類溶液* ¹	1.0 mL
細菌用寒天	12.0 g
水	残 量

pH を 7.5 に調整して、118 15 分間高圧滅菌する。

* 1: 付記 1 の* 1 に同じ。

付記 3 BCP 乳糖寒天培地

1,000mL 中

バクトビーフ・エキストラクト	3.0 g
バクトペプトン	5.0 g
乳糖	10.0 g
寒天	10.0 g
プロモクレゾールパープル	0.025 g

水 残 量
pH を 6.8 ~ 7.0 に調整して、121 15 分間高圧滅菌する。

付記 4 大腸菌 K88 血清

K88 抗原を保有している大腸菌の兔免疫血清を同じ菌株から調製した加熱処理抗原で吸収したもので、あらかじめ K88 抗原の十分な発現を確認した当該菌の不活化抗原と急速凝集反応を行うとき、30 秒以内に凝集しなければならず、当該菌の加熱処理抗原及び K99 保有不活化抗原と急速凝集反応を行うとき、2 分以内に凝集してはならない。

付記 5 大腸菌 K99 血清

K99 抗原を保有している大腸菌の兔免疫血清を同じ菌株から調製した加熱処理抗原で吸収したもので、あらかじめ K99 抗原の十分な発現を確認した当該菌の不活化抗原と急速凝集反応を行うとき、30 秒以内に凝集しなければならず、当該菌の加熱処理抗原及び K88 保有不活化抗原と急速凝集反応を行うとき、2 分以内に凝集してはならない。

付記 6 試験用培地 I

1,000mL 中
トリプチケース・ペプトン 17.0 g
バクトペプトン 3.0 g
ブドウ糖 2.5 g
リン酸水素ニカリウム 2.0 g
塩化ナトリウム 5.0 g
水 残 量
pH を 7.3 に調整して、121 15 分間滅菌する。

付記 7 試験用培地 II

1,000mL 中
トリプチケース・ペプトン 10.0 g
バクトペプトン 5.0 g
塩化ナトリウム 5.0 g
寒天 12.0 g
水 残 量
pH を 7.3 に調整して、121 15 分間滅菌する。

付記 8 精製 K88 抗原

K88 抗原を保有する大腸菌から精製したもので、SDS ポリアクリルアミド電気泳動にかけた場合、23 ~ 26kd に特異的なバンドを認め、他に有意なバンドを認めない。また、電子顕微鏡で線毛様構造物を認める。

付記 9 精製 K99 抗原

K88 抗原を保有する大腸菌から精製したもので、SDS ポリアクリルアミド電気泳動にかけた場合、17 ~ 19kd に特異的なバンドを認め、他に有意なバンドを認めない。また、電子顕微鏡で線毛様構造物を認める。

付記 10 参照陽性血清

K88 抗原、K99 抗原保有菌をそれぞれ約 8 週齢のマウスに注射して得られた抗血清で、抗原吸着プレート（付記 13）で ELISA を実施したとき、その吸光度値が 100 倍希釈血清で 0.6 以上を示す。また更に K88、K99 抗原保有菌体を用いる凝集抗体価測定法（付記 16）では、40 ~ 160 倍を示す。小分けして凍結乾燥し保存する。

付記 11 参照陰性血清

非免疫マウスの血清で、抗原吸着プレートで ELISA を実施したとき、その吸光度値が 100 倍希釈血清で 0.07 以下を示す。また更に K88、K99 抗原保有菌体を用いる凝集抗体価測定法では、2 倍以下を示す。小分けして凍結乾燥し保存する。

付記 12 ポリソルベート 20 添加リン酸緩衝食塩液（ポリソルベート PBS）

1,000mL 中

塩化ナトリウム	8.0 g
塩化カリウム	0.2 g
リン酸二水素カリウム	0.2 g
無水リン酸水素二ナトリウム	2.9 g
ポリソルベート 20	0.5 mL
水	残 量

pH を 7.2 ~ 7.4 に調整する。

付記 13 抗原吸着プレート

精製 K88 抗原、精製 K99 抗原を炭酸緩衝液（付記 17）で至適抗原濃度に希釈し、それぞれ ELISA 用プレートの穴に 0.1mL ずつ加え、4 で 18 時間反応させ、ポリソルベート PBS でよく洗浄し、2 g/dL 牛血清アルブミン液（付記 18）を各穴に 0.25mL 加え、37 で 1 時間反応させた後、ポリソルベート PBS でよく洗浄したもの。

なお、至適の抗原濃度は、精製 K88 抗原及び精製 K99 抗原を炭酸緩衝液で階段希釈して ELISA 用プレートに固相化し、参照陽性血清及び参照陰性血清を 100 倍に希釈したものをを用いて ELISA を実施した場合、その吸光度値が参照陽性血清で 0.6 以上、参照陰性血清で 0.07 以下となるところとする。

付記 14 ペルオキシダーゼ標識抗マウス IgG 液

参照陽性血清の吸光度値を測定するとき、吸光度値が 100 倍希釈で 0.6 以上、参照陰性血清で 0.07 以下を示すように調整して使用する。

付記 15 基質液

o - フェニレンジアミン二塩酸塩 40 mg を、リン酸クエン酸緩衝液（付記 19）100 mL に溶解し、遮光する。使用直前に濃純過酸化水素水を 0.04mL 添加する。

付記 16 凝集抗体価測定法

参照血清として供試する予定の血清をリン酸緩衝食塩液（pH 7.2）で 10 倍に希釈し、チューブ法にて 2 倍階段希釈し、これに K88、K99 抗原保有大腸菌ホルマリン死菌抗原（McFarlandNo.4 に調整）を等量加え、50 2 時間感作後、室温に一晩放置して判定する。凝集の見られる最終希釈を凝集抗体価とする。

付記 17 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 に調整し、4℃ で保存し、1 週間以内に使用する。

付記 18 2 w/v %牛血清アルブミン液

牛血清アルブミン 2 g をポリソルベート PBS100 mL で使用直前に溶解したもの

付記 19 リン酸クエン酸緩衝液

1,000mL 中

無水クエン酸 4.67 g

無水リン酸水素二ナトリウム 19.95 g

水 残 量

pH を 5.0 に調整する。